

**KLINISCHE UND HÄMATOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBAKUTEN
TOXIZITÄT VON ATRAZIN
BEI REGENBOGENFORELLEN
(SALMO GAIRDNERI RICHARDSON)**

Heinz Guthmann

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0114

Aus dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf

Prof. Dr. Dr. habil. W. Ahne

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

**KLINISCHE UND HÄMATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBAKUTEN
TOXIZITÄT VON ATRAZIN BEI REGENBOGENFORELLEN
(SALMO GAIRDNERI RICHARDSON)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Heinz Guthmann

aus
Gunzenhausen

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

1.1.1.1

1.1.1.1

1.1.1.1.1	1.1.1.1.1
1.1.1.1.2	1.1.1.1.2
1.1.1.1.3	1.1.1.1.3
1.1.1.1.4	1.1.1.1.4
1.1.1.1.5	1.1.1.1.5
1.1.1.1.6	1.1.1.1.6
1.1.1.1.7	1.1.1.1.7
1.1.1.1.8	1.1.1.1.8
1.1.1.1.9	1.1.1.1.9
1.1.1.1.10	1.1.1.1.10
1.1.1.1.11	1.1.1.1.11
1.1.1.1.12	1.1.1.1.12
1.1.1.1.13	1.1.1.1.13
1.1.1.1.14	1.1.1.1.14
1.1.1.1.15	1.1.1.1.15
1.1.1.1.16	1.1.1.1.16
1.1.1.1.17	1.1.1.1.17
1.1.1.1.18	1.1.1.1.18
1.1.1.1.19	1.1.1.1.19
1.1.1.1.20	1.1.1.1.20

Meinen lieben Eltern

1.1.1.1.21	1.1.1.1.21
1.1.1.1.22	1.1.1.1.22
1.1.1.1.23	1.1.1.1.23
1.1.1.1.24	1.1.1.1.24
1.1.1.1.25	1.1.1.1.25
1.1.1.1.26	1.1.1.1.26
1.1.1.1.27	1.1.1.1.27
1.1.1.1.28	1.1.1.1.28
1.1.1.1.29	1.1.1.1.29
1.1.1.1.30	1.1.1.1.30
1.1.1.1.31	1.1.1.1.31
1.1.1.1.32	1.1.1.1.32
1.1.1.1.33	1.1.1.1.33
1.1.1.1.34	1.1.1.1.34
1.1.1.1.35	1.1.1.1.35
1.1.1.1.36	1.1.1.1.36
1.1.1.1.37	1.1.1.1.37
1.1.1.1.38	1.1.1.1.38
1.1.1.1.39	1.1.1.1.39
1.1.1.1.40	1.1.1.1.40

I n h a l t

I.	Einleitung	1
II.	Literaturübersicht	
1.	Substanzcharakterisierung	2
1.1	Chemische Bezeichnung	2
1.2	Strukturformel	2
1.3	Handelsprodukte	2
1.4	Physikalisch-chemische Eigenschaften	2
1.5	Anwendung und Wirkungsweise	3
1.6	Besondere Kennzeichen und Auflagen	4
2.	Umweltrelevanz	4
2.1	Gewässerbelastung	4
2.1.1	Kontaminationsmöglichkeiten	5
2.1.2	Beeinflussende Faktoren	5
2.2	Abbaubarkeit in Gewässern	5
2.3	Bioakkumulation	7
2.3.1	Phytoplankton	7
2.3.2	Wirbellose	7
3.	Atrazinaufnahme und -verteilung beim Fisch	8
3.1	Aufnahmemechanismen	8
3.2	Verteilung im Organismus	9
4.	Toxizität gegenüber aquatischen Evertebraten	12
4.1	Akute Wirkungen	12
4.2	Subakute Wirkungen	12
4.2.1	Daphnia pulicaria	12
4.2.2	Ancylus fluviatilis	12
5.	Fischtoxizität	14
5.1	Akute Wirkungen	14
5.1.1	Klinische Veränderungen	14
5.1.2	Pathologisch-anatomische Veränderungen	16
5.1.3	Biochemische Veränderungen	16

5.1.4 Hämatologische Veränderungen	17
5.2 Subakute Wirkungen	18
5.3 Chronische Wirkungen	19
5.3.1 Primär toxische Wirkungen	19
5.3.2 Indirekte Wirkungen	20
6. Vorhersagbarkeit langfristiger Schadwirkungen	21
 III. Eigene Untersuchungen	 24
1.1 Rahmenbedingungen	24
1.1.1 Prüfvorschriften	24
1.1.2 Stammlösungsherstellung	24
1.1.3 Versuchstiere	24
1.1.4 Hälterungsbedingungen	25
1.1.5 Wassertemperatur	25
1.1.6 Sauerstoffgehalt des Wassers	25
1.1.7 Lichtverhältnisse	26
1.1.8 Wasseruntersuchung	26
1.1.9 Entsorgung des Testwassers	26
1.2 Kurzzeittest	26
1.2.1 Testfische	26
1.2.2 Versuchsbedingungen	26
1.2.3 Versuchsdurchführung	27
1.2.4 Betäubung	27
1.2.5 Blutentnahme	28
1.3 Langzeittest I	28
1.3.1 Testfische	28
1.3.2 Versuchsbedingungen	28
1.3.3 Versuchsdurchführung	31
1.3.4 Betäubung und Blutentnahme	31
1.4 Langzeittest II	32
1.4.1 Testfische	32
1.4.2 Versuchsbedingungen	32
1.4.3 Versuchsdurchführung	32

1.4.4	Betäubung	32
1.4.5	Blutentnahme	33
1.4.6	Plasmagewinnung	33
2.	Untersuchungsmethoden	33
2.1	Klinische Beobachtung	33
2.2	Blutuntersuchung	35
2.2.1	Kurzzeit- und Langzeittest I	35
2.2.2	Langzeittest II	35
2.2.3	Auswertung	36
2.3	Plasmaenzymuntersuchung	36
2.4	Pathologische und histopathologische Untersuchung	37
IV.	Ergebnisse	37
1.	Kurzzeittest	37
1.1	Klinische Befunde	37
1.1.1	Atrazinkonzentration: 1,4 ppm	37
1.1.2	Atrazinkonzentration: 2,8 ppm	37
1.2	Hämatologische Befunde	39
1.2.1	Hämatokrit	39
1.2.2	Erythrozytenmessungen	40
1.3	Pathologisch-anatomische und histologische Befunde	43
2.	Langzeittest I (28 Tage)	44
2.1	Klinische Befunde	44
2.2	Hämatologische Befunde	44
2.2.1	Hämatokrit	44
2.2.2	Erythrozytenmessungen	45
2.3	Pathologisch-anatomische und histologische Befunde	47
3.	Langzeittest II	48
3.1	Klinische Befunde	48
3.2	Hämatologische Befunde	48
3.3	Enzymaktivitäten im Plasma	50
3.4	Pathologisch-anatomische Befunde	54

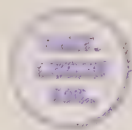
V. Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion	55
1. Hämatologische Parameter beeinflussende Faktoren	55
2. Klinische Befunde	56
3. Hämatologische Veränderungen	57
4. Enzymdiagnostik in der Fischtoxikologie	60
5. Enzymaktivitätsänderungen im Langzeitversuch	61
6. Schwellenkonzentrationen der Atrazinwirkung für verschiedene Prüfparameter	63
7. Vergleich der Methoden und Ergebnisse von Kurzzeittest und Langzeittest	64
VI. Zusammenfassung	66
Summary	68
VII. Literaturverzeichnis	70

I. EINLEITUNG

Atrazin ist einer der meistverwendeten Herbizidwirkstoffe in der Bundesrepublik Deutschland. In den letzten Jahren häuften sich Meldungen über Atrazinfunde in Grundwässern und Oberflächengewässern, wobei die von der EG festgesetzten Schadstoff-Höchstgrenzen weit überschritten wurden (BRAUN et al., 1987).

Neben einer möglichen Gesundheitsgefährdung des Menschen durch kontaminiertes Trinkwasser steht v.a. auch die hohe Belastung ständig schadstoffexponierter aquatischer Organismen im Vordergrund. Bisherige Untersuchungen zur Fischtoxizität von Atrazin betrafen meist nur dessen akute Wirkungen, während der Kenntnisstand über subakute und chronische Wirkungen sehr gering ist.

Ziel vorliegender Arbeit ist es deshalb, mit Hilfe klinischer und hämatologischer Methoden subakute Wirkungen auf Fische (Regenbogenforellen) zu erfassen.



II. LITERATURÜBERSICHT

1. Substanzcharakterisierung

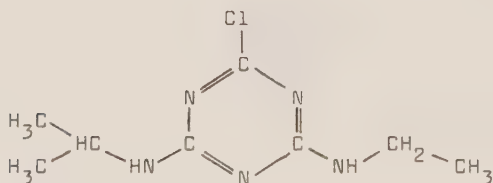
Atrazin ist ein herbizider Wirkstoff aus der Gruppe der chlor-substituierten s-Triazine. Es wurde bei der J.R. Geigy AG, Basel, synthetisiert und 1958 unter dem Namen "Gesaprim" auf dem Markt eingeführt (MAIER-BODE, 1971).

1.1 Chemische Bezeichnung

- a. 2-chlor-4-äthylamino-6-isopropylamino-s-triazin
- b. 2-chlor-4-äthylamino-6-isopropylamino-1,3,5,-triazin

CAS-Nummer: 1912-24-9

1.2 Strukturformel



1.3 Handelsprodukte

Atrazin, Gesaprim, Mais-Certol, Primatol, Vorox u.v.a.
(INDUSTRIEVERBAND PFLANZENSCHUTZ e.V., 1982).

1.4 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Wichtige physikalische und chemische Eigenschaften von Atrazin sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Die physikalischen und chemischen Eigenschaften
von Atrazin

Physikalische Beschaffenheit:	kristallin, farblos
Molekulargewicht:	215,69
Wasserlöslichkeit:	bei 0°C 22 ppm (MAIER-BODE, 1971) 5 ppm (PERKOW, 1985) 20°C 33 ppm (MAIER-BODE, 1971) 70 ppm (PERKOW, 1985) 85°C 320 ppm (MAIER-BODE, 1971)
Siedepunkt:	nicht destillierbar
Schmelzpunkt:	176°C
Dampfdruck:	4,0 x 10 ⁻⁷ mbar bei 20°C (INDUSTRIEVERBAND PFLANZENSCHUTZ e.V., 1982) 3,0 x 10 ⁻⁷ mm Hg bei 20°C (MAIER-BODE, 1971)
Verteilung n-Oktanol/ Wasser	2,64

1.5 Anwendung und Wirkungsweise

Als selektives Boden und Blattherbizid wird Atrazin vor allem im Maisanbau, daneben in Spargel-, Hirse-, Zuckerrohr- und Ananaskulturen, unter Kernobst und im Weinbau verwendet. Auf nichtlandwirtschaftlichen Flächen wird es in Kombination mit anderen Wirkstoffen als Totalherbizid eingesetzt (PERKOW, 1985).

Die durchschnittliche Aufwandmenge im Maisanbau liegt bei etwa 1,3 kg/ha (HABERER und NORMANN, 1988). Bei der Anwendung in Kernobstkulturen werden bis zu 5 kg/ha Wirkstoffdosierung erreicht.

Die Toleranzgrenzen der Atrazin-Rückstände liegen nach der Höchstmengen-VO in der Bundesrepublik bei 0,1 ppm in Blatt-, Frucht- und Wurzelgemüse, bzw. 1 ppm in Spargel (MAIER-BODE, 1971).

Atrazin kann von der Pflanze sowohl über die Wurzeln als auch über ihre oberirdischen Teile aufgenommen werden. Die Hauptwirkung besteht in einer Unterbindung der Photosynthese in ihren ersten Schritten (Hemmung der Hillreaktion) (MAIER-BODE, 1971). Dies hat für die Pflanze eine verminderte ATP- und Glucose-Produktion zur Folge. Außerdem werden durch Atrazin verschiedene Enzymaktivitäten verändert. Aufgrund dieser Veränderungen stirbt die Pflanze schließlich ab (FUNDERBURK and DAVIS, 1963).

Die Dauer der phytotoxischen Wirkung im Boden kann von 2 - 4 Monaten bis zu 3 Jahren reichen und ist von Aufwandsmenge, Bodenart, Anwendungszeit und anderen Faktoren abhängig (MAIER-BODE, 1971).

1.6 Besondere Kennzeichen und Auflagen

Atrazin wird als "nicht bienengefährlich" eingestuft (Kennzeichen: B 4). Seine Anwendung in unmittelbarer Nähe von Gewässern ist nicht zulässig; die Anwendung in Wasserschutzzone III ist erlaubt (diese Bestimmungen entsprechen den wasser-schutzrechtlichen Auflagen "230" und "W 2") (ANONYM, 1983).

2. Umweltrelevanz

2.1 Gewässerbelastung

Trotz des Verbots der direkten Anwendung in und an Gewässern gelangt Atrazin nach seiner Ausbringung in nachweisbaren Mengen in Oberflächengewässer und Grundwässer.

Tabelle 2 enthält einige in der Literatur erwähnte Meßwerte.

2.1.1 Kontaminationsmöglichkeiten

Folgende Quellen kommen für eine Gewässerkontamination durch Atrazin in Betracht:

- Auswaschung durch Niederschläge
- Abschwemmung (Drän- und Hangwasser)
- Abdrift (Wind und Regen)
- Unbeabsichtigte bzw. fahrlässige Zufuhr
(BUNDESAMT FÜR ERNÄHRUNG UND FORSTWIRTSCHAFT, 1983)

2.1.2 Beeinflussende Faktoren

Der Umfang des Atrazineintrages in Gewässer ist neben der Aufwandsmenge auch von Niederschlagsmenge und -zeitpunkt sowie von der Hangneigung der behandelten Flächen abhängig (PENSEL, 1985). So fanden HALL et al. (1972) und HALL (1974) eine Auswaschrates zwischen 1,7 und 15,9 % des applizierten Atrazins in Abhängigkeit von Hangneigung (bis 14 %) und Niederschlagsintensität. Die höchsten Atrazinkonzentrationen konnten jeweils nach dem ersten Regenereignis festgestellt werden. Eine weitere Einflußgröße ist die Beschaffenheit des Bodens, der über seine Adsorptionskapazität den Umfang einer möglichen Auswaschung beeinflußt (MAIER-BODE, 1971).

2.2 Abbaubarkeit in Gewässern

Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von Atrazin wird mit $t_{1/2} = 244$ Tage in destilliertem Wasser angegeben. In drei natürlichen Gewässern (pH = 3,8 - 8,1) konnte innerhalb eines Monats kein Abbau festgestellt werden (RIPPEN, 1987). Im Freilandversuch wurden in Teichen bei einer Atrazinkonzentration von 0,3 ppm nach 120 Tagen noch 0,206 ppm gemessen (pH = 7,0 - 8,6).

Tabelle 2: Atrazinkonzentrationen in der Umwelt (in µg/l)

Fundort	gemessene Konzentration	Quelle
Rhein (km 507)	0,05 - 0,3	HABERER, KARRENBROCK und OEHMICHEN (1985)
Main	0,1 - 0,2	GISSL und HURLE (1984)
Donau (bei Ziefaltendorf)	0,03 - 1,15	BRAUN, SCHÜSSLER und WEHRLE (1987)
Isar (bei München)	1,1 - 1,5	PENSEL (1985)
Prüm (Rheinlandpfalz)	<0,26	" "
Enz	<1,1	" "
Niems	<0,98	" "
Grundwasser (Bayern, Baden Württemberg, Nordrhein-Westfalen, Nieder- sachsen, Schleswig-Holstein)	>0,5	HABERER und NORMANN (1988)
Niederschlag (Fichtelberg)	3,5	BRAUN, SCHÜSSLER und WEHRLE (1987)

In Gräben mit einer Atrazin-Anfangskonzentration von 1,6 ppm wurden nach 133 Tagen noch 0,067 ppm festgestellt (DEUTSCHER VERBAND FÜR WASSERWIRTSCHAFT UND KULTURBAU e.V. (1985).

Bei der Einstufung auf leichte Bioabbaubarkeit innerhalb von 28 Tagen erwies sich Atrazin als "nicht leicht bioabbaubar" (RUDOLPH, 1986).

2.3 Bioakkumulation

2.3.1 Phytoplankton

Die Atrazinaufnahme durch Phytoplankter erfolgt sehr schnell. Ein Sättigungswert ist nach 2-4 Stunden erreicht, wobei je nach Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft Anreicherungs-faktoren zwischen 27 und 1203 erreicht werden (GUNKEL, 1983 und 1984). Eine deutliche Depression der Nettoproduktion von Phytoplanktongemeinschaften in Fließgewässern nach einer chronischen Atrazinbelastung von 0,01 ppm stellten KOSINSKI und MERKLE (1984) fest. TORRES und O'FLATHERY (1976) konnten eine Atrazinwirkung auf Phytoplankton bereits ab Schadstoffkonzentrationen von 0,1 - 1 µg/l nachweisen. Für verschiedene Planktonalgen wurde bei einer Atrazinkonzentration von 1 µg/l und einer Expositionszeit von 7 Tagen eine Reduzierung der Chlorophyllproduktion von mindestens 50 % gemessen.

2.3.2 Wirbellose

Die Atrazin-Anreicherungs-faktoren (AF_{vol}) erreichen für verschiedene Evertrebraten Maximalwerte von $AF_{vol} = 2-50$. Damit liegen sie deutlich niedriger als die Anreicherungs-faktoren für Phytoplankter. Die Schadstoffaufnahme erfolgt ebenfalls sehr schnell, wobei der Sättigungswert der Akkumulation innerhalb einer bis weniger Stunden erreicht wird (GUNKEL, 1987).

Bei einem Vergleich der Atrazinaufnahme über die Nahrung bzw. direkt über das Wasser, fand STREIT (1979) bei Zwergmützen-schnecken (*Ancylus fluviatilis*) bezüglich des Akkumulationsverlaufes sowie der Höhe des Akkumulationsgleichgewichtes keine signifikanten Unterschiede. Die Höhe des Akkumulationsgleichgewichtes wird jedoch sowohl vom stoffwechselphysiologischen Zustand der Tiere als auch von der Atrazinkonzentration des Wassers beeinflusst.

3. Atrazinaufnahme und -verteilung beim Fisch

3.1 Aufnahmemechanismen

Atrazin wird von Fischen sehr rasch aufgenommen. Grundsätzlich stehen zwei Aufnahmemechanismen zur Verfügung (GUNKEL, 1984):

- a. Direkte Aufnahme aus dem Wasser, über Kiemen, Haut und z.T. über den Magen-Darm-Trakt mit dem Trinken.
- b. Aufnahme über die kontaminierte Nahrung.

Bei der Aufnahme über das Wasser spielen die Kiemen eine besondere Rolle (GUNKEL, 1987). Zum einen werden sie ständig von kontaminiertem Wasser umspült, andererseits sind sie durch ihre Blutfülle in der Lage, den Schadstoff schnell an andere Organe weiterzuleiten. Ein Sättigungsgleichgewicht ist nach etwa 6 Stunden erreicht, eine 50 %ige Anreicherung ist bereits nach etwa 90 Minuten festzustellen. GUNKEL und KAUSCH (1976) konnten für Sandfelchen (*Coregonus nasus*) einen auf den Gesamtkörper bezogenen Anreicherungsfaktor zwischen 2 und 5 bestimmen. Für die Muskulatur der Regenbogenforelle wurde ein Anreicherungsfaktor zwischen 2 und 3 nachgewiesen (BATHE und ULLMANN, 1972).

Bei der Akkumulation über kontaminierte Nahrung wird das Sättigungsgleichgewicht erst nach einem bis wenigen Tagen erreicht, wobei auch die Akkumulationsfaktoren etwas geringer als diejenigen bei direkter Aufnahme aus dem Wasser liegen (GUNKEL, 1981). Bedingt durch wirksame Ausscheidungsmechanismen verringert sich die Menge des nachweisbaren Atrazins bei ausschließlicher Aufnahme über die Nahrung sehr schnell innerhalb 12 Stunden.

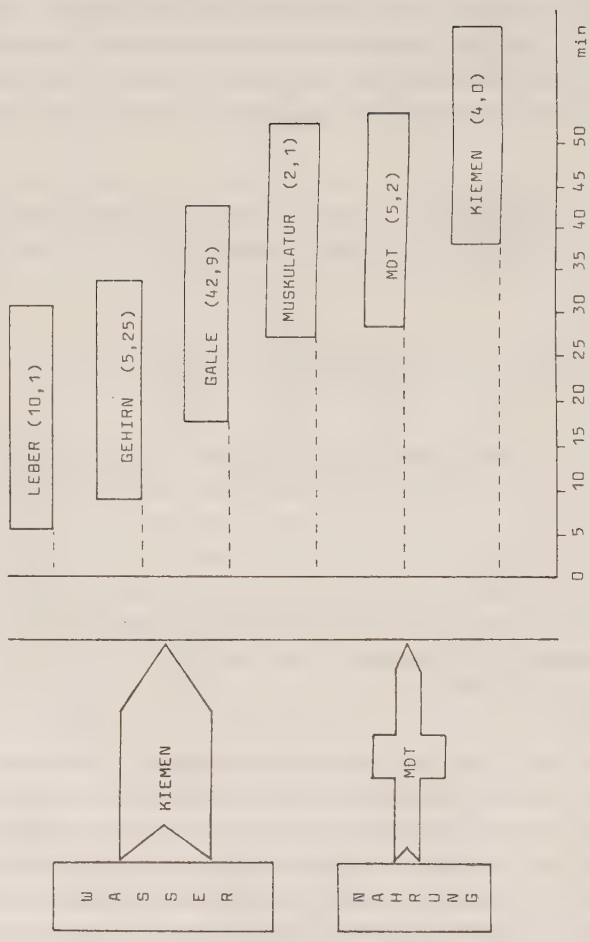
Generell erfolgt die Ausscheidung von Atrazin zum Überwiegenden Teil über die Kiemen, unabhängig davon, ob die Aufnahme über das Wasser oder die Kiemen erfolgte. Eine Dekontamination bis unterhalb der Nachweisgrenze dauert mehrere Tage (GUNKEL, 1981).

3.2 Verteilung im Organismus

Nach Untersuchungen von GUNKEL und STREIT (1980) spielt der Blutkreislauf bei der Verteilung von Atrazin im Organismus, unabhängig vom Aufnahmeweg, eine zentrale Rolle. Obwohl eine Atrazinkontamination in allen Organen nachzuweisen ist, zeigen sich in bezug auf die Aufnahmegeschwindigkeit und die Anreicherungsfaktoren erhebliche Unterschiede der einzelnen Organe. Es werden Anreicherungsfaktoren von $AF_{vol} = 3-40$ erreicht (RUDOLPH, 1986).

Eine Übersicht zu Kontaminationswegen, Anreicherungszeiten und -faktoren der einzelnen Organe zeigt Abbildung 1. Hohe Anreicherungsfaktoren werden von den fettreichen Organen Leber, Magen, Darm und Gehirn erreicht. Geringere Anreicherungsfaktoren werden in der fettärmeren Muskulatur sowie in den Kiemen festgestellt (GUNKEL, 1981). Sowohl der Stoffwechselzustand der Tiere als auch die Wassertemperatur haben keinen signifikanten Einfluß auf die Höhe der Anreicherung. Untersuchungen über einen eventuellen Einfluß von Jahreszeit bzw. Sexualzyklus der Fische liegen nicht vor. Der besonders hohe Anreicherungsfaktor der Leber wird von BIAGIANTI (1986) durch eine vermehrte

Abbildung 1: Aufnahmewege und Anreicherung von Atrazin im Fisch.
 Angegeben sind Anreicherungsfaktoren (in Klammern) und
 Zeit (gestrichelte Linie) bis zum Erreichen des AF_{vol} 1.



(modifiziert nach GUNKEL und STREIT, 1990)

Lipideinlagerung unter Atrazineinfluß erklärt. Nach GUNKEL (1981) ist die hohe Atrazinanreicherung der Leber nicht allein durch deren hohen Fettgehalt zu erklären, sondern z.T. auch durch die große innere Oberfläche des Organs.

4. Toxizität gegenüber aquatischen Evertebraten

4.1 Akute Wirkungen

Untersuchungen zur akuten Toxizität von Atrazin gegenüber aquatischen Evertebraten hatten bisher vor allem die Ermittlung von LC (=lethal concentration) -Werten zum Ziel. Daneben wurde versucht, andere, nicht letale Wirkungen quantitativ zu erfassen (z.B. EC-Werte). Einige Daten zur akuten Toxizität sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Daten zur akuten Toxizität von Atrazin gegenüber aquatischen Evertebraten

	LC ₅₀ /48 h (ppm)	EC ₅₀ /28 d (ppm)	Quelle
Wasserfloh (<i>Daphnia magna</i>)	3,6		RIPPEN (1987)
Zwergmützenschnecke (<i>Ancylus fluviatilis</i>)	10		STREIT und PETER (1978)
Blutegel:			
- <i>Glossiphonia complanata</i>		6,3	STREIT und PETER (1978)
- <i>Helobdella stagnalis</i>		9,9	STREIT und PETER (1978)

4.2 Subakute Wirkungen

4.2.1 *Daphnia pulicaria*

POTT (1982) konnte bei Daphnien eine Verminderung der Ingestionsrate um 50 % bei einer Atrazinkonzentration von 1,6 ppm nachweisen. Auch die Reproduktionsrate der Tiere vermindert sich

mit zunehmender Atrazinkonzentration (SCHÖBER und LAMBERT, 1977). Nach 8tägigem Aufenthalt in verschiedenen Atrazinkonzentrationen zeigte sich auch eine Wachstumshemmung der Tiere.

4.2.2 *Ancylus fluviatilis*

STREIT und PETER (1978) beschreiben für *Ancylus fluviatilis* eine Zunahme der Ingestionsrate bei steigenden Atrazinkonzentrationen (1-16 ppm). Neben einer gesteigerten Freßaktivität der Schnecken konnten sie "Anomalien" des Freßverhaltens beobachten. Trotz erhöhter Futteraufnahme war das Wachstum - speziell der Jungtiere - gehemmt. Weitere subletale Effekte betrafen die Reproduktion der Tiere. Bei Atrazinkonzentrationen von 1,4 und 16 ppm war die Zahl der abgelegten Eikapseln pro Tier reduziert. Außerdem enthielten die Eigelege weniger Eier. Ab einer Atrazinkonzentration von 1 ppm wurden Störungen der Embryogenese vermutet, da nach mehrwöchiger Expositionszeit bei der Eientwicklung Verluste von 60 % auftraten.

5. Fischtoxizität

Zahlreiche Untersuchungen belegen die Fischtoxizität von Atrazin. Hinsichtlich der Expositionszeiten erfolgt eine Einteilung in "akute" (Dauer: <96 h), "subakute" (Dauer: <30 Tage) und "chronische" (Dauer: mehrere Monate) Toxizität. Während die akuten Schadwirkungen unter Anwendung verschiedener Methoden vielfach beschrieben bzw. Letalkonzentrationen festgelegt wurden, ist das vorliegende Datenmaterial zur subakuten und chronischen Toxizität sehr gering.

5.1 Akute Wirkungen

Eine Zusammenstellung bisher ermittelter LC-Werte zeigt Tabelle 4.

5.1.1 Klinische Veränderungen

Änderungen des Verhaltens werden von verschiedenen Autoren als Kriterium zur Beurteilung der Schadstoffwirkung herangezogen.

KORPRIVA (1981) charakterisiert das klinische Bild einer akuten Atrazinvergiftung bei Regenbogenforellen (Atrazinkonzentrationen: 26,4 ppm, Dauer: 48 h) durch Phasen suppressiven Verhaltens. Auch bei Versuchen von BATHE und ULLMANN (1972) mit Regenbogenforellen wurden bei einer Schadstoffkonzentration von 8,8 ppm und einer Expositionszeit von 96 Stunden Apathie, Koordinationsstörungen und schließlich eine allgemeine Paralyse der Tiere beobachtet. Außerdem traten dosisabhängig "Blähungserscheinungen" auf.

Detaillierte Untersuchungen über den Ablauf einer akuten Atrazinvergiftung bei Brütlingen von Sandfelchen (*Coregonus nasus*) liegen von GUNKEL und KAUSCH (1976) vor:

Als erste sichtbare Veränderung nach einer Exposition zeigen die Tiere Fluchtverhalten. Im weiteren Verlauf werden eine zeitweise gesenkte Aktivität sowie Gleichgewichtsstörungen mit anschließender Seitenlage beobachtet. Nach einer längeren Phase vollständiger Immobilität tritt der Tod der Tiere ein.

Tabelle 4: Daten zur akuten Fischtoxizität von Atrazin

Exposititonszeit	LC ₅₀ /48 (ppm)	LC ₅₀ /96 h (ppm)	Quelle
Fischart			
Regenbogenforelle (<i>Salmo gairdneri</i>)	10 10 26,4	8,8 4,8	BATHE u. ULLMANN (1971) MAIER-BODE (1971) KOPRIVA (1981)
Bachsaibling (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	4,9		MACEK et al. (1976)
Zebraabrbliing (<i>Brachidanio rerio</i>)	37		KORTE et al. (1981)
Amerikanische Elritze (<i>Fathead minnow</i>)	15		MACEK et al. (1976)
Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	50		KOPRIVA (1981)
Karassche (<i>Carassius carassius</i>)		76	BATHE u. ULLMANN (1972)
Sonnenbarsch (<i>Lepomis macrochirus</i>)		16	BATHE u. ULLMANN (1972)
Sandfelchen (<i>Coregonus nasus</i>)	33,3	11,2	GUNKEL u. KAUSCH (1976)

Bei der Ermittlung der "median effective time" in bezug auf eine Immobilität der Tiere konnte grob zwischen Konzentrationen unter 15 ppm und solchen darüber unterschieden werden. Im Bereich von 3-15 ppm ist der Einfluß der Konzentration relativ gering; Immobilität der Fische tritt nach etwa einer Woche ein. Ab einer Konzentration von 15 ppm nimmt die Zeit bis zur Immobilität rasch ab.

Ein verändertes Raumverhalten nach Atrazinexposition (Konzentrationsbereiche sind nicht genannt) stellte WALSH (1975) bei der Amerikanischen Seeforelle (*Salvelinus namaycush*) fest. Die Tiere hielten sich vorwiegend direkt unter der Wasseroberfläche auf.

5.1.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Bachsaiblinge zeigen ab einer Atrazinkonzentration von 1,4 ppm eine deutliche Dunkelfärbung (MACEK et al., 1976). WALSH (1975) interpretiert diese Dunkelverfärbung, die er auch an Amerikanischen Seeforellen feststellte, als Ausdruck einer Blindheit. Diese ist möglicherweise als Folge eines erhöhten Intraorbitaldruckes zu interpretieren, wie es sicher bei den Tieren der Fall war, die einen Exophthalmus aufwiesen.

Bei allen Tieren konnten außerdem Ödeme in unterschiedlichem Ausmaß und verschiedenen Lokalisationen festgestellt werden. Neben einem Ascites fanden sich Ödeme in Muskulatur, Magen-Darm-Trakt und Schwimmblase. Bei allen exponierten Tieren wurde ein mucöser Belag auf den Kiemen festgestellt (WALSH, 1975).

Transsudatansammlungen in der Leibeshöhle und im Digestions-trakt nach Atrazinexposition (12,8 - 26,4 ppm) werden bei der Regenbogenforelle beschrieben (KOPRIVA, 1981).

5.1.3 Biochemische Veränderungen

GLUTH und HANKE (1985) untersuchten die Auswirkungen suble-taler Atrazinkonzentrationen auf physiologische Parameter des Karpfens. Die Expositionszeiten betrugen 6, 24 und 72 Stunden. Die geprüfte Atrazinkonzentration von 0,1 ppm lag um ein 750faches unter dem für diese Fischgattung ermittelten $LC_{50}/96\text{ h}$ (BATHE und ULLMANN, 1972). Signifikante Erhöhungen des Serumglucose-sowie des Serumcortisol-Spiegels konnten festgestellt werden.

Dabei erreichte der Glucosespiegel bereits nach 6 Stunden sein Maximum, während der stärkste Einfluß auf den Cortisolspiegel nach 72 Stunden gemessen wurde.

Eine Erniedrigung des Protein- und Cholesterol-Serumspiegels wurde ebenfalls nach 72 Stunden festgestellt. Die Bestimmung des Glykogengehaltes von Leber und Muskulatur ergab eine signifikante Erniedrigung nach 72 Stunden.

Im akuten Fischtest mit Karpfen (Expositionszeit: 3-7 Tage, Atrazinkonzentration: 1-10 ppm) stellten BITTNER et al. (1980) eine Erhöhung der Blutserum-Osmolalität nach 1-4 Einwirkungsstunden fest. Eine Dehydratation der Muskulatur wurde beobachtet und durch die Annahme eines Elektrolytverlustes erklärt.

5.1.4 Hämatologische Veränderungen

Die Bestimmung der Erythrozyten-Gesamtzahl erwies sich in Untersuchungen von HORN und HANKE (1980) als geeignete Methode zum Nachweis einer akuten Atrazinvergiftung. Bereits eine Konzentration von 0,1 ppm bewirkte eine Abnahme der Erythrozyten nach 48 Stunden. Gleichzeitig nahm der Anteil geschädigter Erythrozyten proportional zu steigender Atrazinkonzentration und Einwirkungszeit zu.

Der Atrazineinfluß auf das weiße Blutbild ist stark konzentrationsabhängig. Während sich bei einer Belastung von 10 ppm die Anzahl der azurophilen Granulozyten erhöhte, sank deren Anteil bei Konzentrationen von 1 bzw. 0,1 ppm. Bezüglich großer und kleiner Lymphozyten stellten die Autoren einen zahlenmäßigen Anstieg in allen Konzentrationsbereichen fest.

5.2 Subakute Wirkungen

Histologische Untersuchungen zur subakuten Toxizität von Atrazin auf juvenile Meerbarben (*Liza aurata* und *Liza ramada*) liegen von BIAGIANTI (1986) vor. Bei der Ausprägung der pathologischen Veränderungen war eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit festzustellen. Drei Konzentrationsbereiche wurden unterschieden:

a. Atrazinkonzentration: 0,28 ppm

Nach einer Expositionszeit von 7 Tagen konnten nekrotische Areale im Leberparenchym festgestellt werden. Innerhalb der 3wöchigen Expositionszeit starben alle Jungtiere.

b. Atrazinkonzentration: 0,16 ppm

Nach 9tägiger Exposition zeigen die Tiere deutliche Leberveränderungen. Das Auftreten großer Lipidtröpfchen im gesamten Zytoplasma der Leberzellen wird vom Autor als atrazinbedingte, vermehrte Fettspeicherung interpretiert. Elektronenmikroskopisch wurden in einigen Fällen Lipideinschlüsse auch in den Leberzellkernen nachgewiesen. Die Membranen von Zellkern und rauhem endoplasmatischem Retikulum (rER) waren teilweise zerstört. Ein Anstieg von "lysosomenartigen" Zellstrukturen wurde festgestellt.

c. Atrazinkonzentration: 0,025 ppm

Ultrastrukturelle Veränderungen der Leber, die auf stattfindende Entgiftungsmaßnahmen schließen lassen, fanden sich noch bei der niedrigsten geprüften Konzentration. Glattes und rauhes ER zeigten eine starke Ausprägung. Die Mitochondrien standen in enger räumlicher Beziehung um ER. Das zahlreiche Auftreten kleiner Lipidtröpfchen wurde festgestellt.

In Milzen atrazinexponierter Amerikanischer Seeforellen (*Salvelinus namaycush*) diagnostizierte WALSH (1975) eine Vermehrung des Bindegewebes sowie eine Verminderung des Zellgehaltes.

5.3 Chronische Wirkungen

Daten zur chronischen Fischtoxizität von Atrazin sind in Tabelle 5 dargestellt. Dabei werden **NOEC** als höchste geprüfte Konzentration ohne letale oder andere sichtbare Wirkung (HERBST, 1985) und **MATC** als höchste dauernde Konzentration einer toxischen Substanz, die nicht signifikant einen "Laborfisch Produktions-index" negativ beeinflusst (BARDACH and LIFE, 1976), definiert.

Tabelle 5: Daten zur chronischen Fischtoxizität von Atrazin (Konzentrationsangaben in ppm)

MATC (maximum acceptable toxicant concentration):

Amerikanische Elritze: (Fathead minnow)	>0,21	<0,52	(MACEK et al., 1976)
Bachforelle (Salmo trutta)	>0,06	<0,12	(MACEK, et al., 1976)

NOEC (no observed effect concentration):

Zebrabärbling: (Brachidanio rerio)	14 d	0,95 - 2,13	(RUDOLPH, 1986)
	28 d	0,08 - 0,16	(RUDOLPH, 1986)

5.3.1 Primär toxische Wirkungen

Das Wachstum von Fischen wird von MACEK et al. (1976) als empfindlichster Prüfparameter einer chronischen Atrazinvergiftung angegeben, wobei das Alter der Tiere die Empfindlichkeit gegenüber dem Schadstoff deutlich beeinflusst. So zeigte sich bei Bachsaiblings-Jährlingen (*Salvelinus fontinalis*), die 44 Wochen lang Atrazinkonzentrationen bis zu 0,72 ppm ausgesetzt waren, keine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei einer Atrazinkonzentration von 0,24 ppm und einer Expositionszeit von 90 Tagen wurde eine signifikante Reduzierung

von Körpergewicht und Gesamtlänge der Tiere festgestellt. Bei Bachsaiblings-Brütlingen dagegen waren Körpergewicht und Gesamtlänge der Tiere noch bei einer Konzentration von 0,12 ppm und einer Expositionszeit von 306 Tagen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt. Außerdem erschienen die Tiere apathisch und zeigten eine reduzierte Futteraufnahme.

Eine deutliche Reduzierung der Überlebensrate konnte für die Bachsaiblings-Brütlinge nach 60tägiger Exposition und einer Atrazinkonzentration von 0,24 ppm nachgewiesen werden.

5.3.2 Indirekte Wirkungen

Ein mittelbarer Einfluß von Atrazin auf die Reproduktionsleistung von Sonnenbarschen (*Lepomis macrochirus*) konnte von KITTLE et al. (1987) gezeigt werden. Versuchsteiche mit einer Atrazinkonzentration von 0,02 und 0,5 ppm wurden mit je 50 Elterntieren besetzt. Die Anzahl der Sonnenbarsch-Brütlinge, die nach 136tägiger Versuchsdauer aus den Teichen gefischt werden konnten, war im Vergleich zu Kontrollteichen signifikant erniedrigt, wobei in bezug auf die Sterblichkeitsrate der Elterntiere keine Unterschiede auftraten. Als Ursache des verminderten Reproduktionserfolges wird der reduzierte Pflanzenbewuchs in den Atrazin-behandelten Teichen genannt, wodurch die Brütlinge - mangels Versteckmöglichkeiten in diesen Teichen - einem erhöhten Raubdruck von seiten der Elterntiere ausgesetzt waren.

Der Raubdruck wurde durch ein vermindertes Nahrungsangebot in den Versuchsteichen noch verstärkt, wie durch eine Untersuchung des Mageninhaltes der Fische belegt werden konnte. Sowohl quantitativ als auch in bezug auf die Vielfalt der Nahrungsbestandteile ergab sich eine signifikante Reduzierung im Vergleich zum Kontrollteich.

6. Vorhersagbarkeit langfristiger Schadwirkungen

Der Gesetzgeber ist bei der Festlegung von Schadstoff-Höchstgrenzen für den aquatischen Bereich auf Entscheidungshilfen seitens der Wissenschaft angewiesen (IRMER et al., 1986). Das Datenmaterial zur chronischen Toxizität von Atrazin ist jedoch gering. Es wurden deshalb in der Vergangenheit verschiedene Versuche unternommen, die langfristige Toxizität wasser- und damit fischgefährdender Stoffe aus den Ergebnissen relativ einfach durchzuführender und kostengünstiger akuter Toxizitätstests mittels rechnerischer Methoden zu ermitteln (KENAGA, 1982a).

Als Lösungsansatz hierzu entwickelten MOUNT and STEPHAN (1976) das Konzept des "application factor" (AF). Der Faktor wird aus dem Quotienten von MATC (maximum acceptable toxicant concentration) aus dem Langzeitversuch und $LC_{50}/96\text{ h}$ berechnet. Ein ähnliches Konzept stellt die Berechnung einer "acute chronic ratio" (ACR) dar (KENAGA, 1982b), die sich durch die Formel $ACR = 1/AF$ ausdrücken läßt. Basierend auf Untersuchungen an 84 Industriechemikalien geht KENAGA davon aus, daß die chronische Fischtoxizität dieser Stoffe in 93 % der Fälle bei Verwendung eines ACR-Faktors von maximal 25 aus den Ergebnissen des akuten Tests abzuschätzen ist.

Für unterschiedliche Versuchstierspezies konnten dabei vergleichbare ACR-Werte festgestellt werden. So zeigte sich eine gute Korrelation der ACR-Werte für Amerikanische Elritze (Fathead minnow) und Wasserfloh (*Daphnia magna*). Der Autor sieht deshalb in solchen Fällen die Möglichkeit, die im chronischen Toxizitätstest für eine Spezies ermittelten Werte auf eine andere zu übertragen.

Die ACR-Werte für Atrazin lagen für Amerikanische Elritze, Sonnenbarsch, Seeforelle und Wasserfloh in einem Bereich von $ACR = 22-44$.

Die Vorgehensweise, aus den Ergebnissen akuter Tests mittels bestimmter Faktoren langfristige Schadwirkungen vorherzusagen, wird von zahlreichen Autoren kritisiert (RAND, 1980; SCHULZ, 1980).

RUDOLPH (1986) stellt die Unzulänglichkeit von Sicherheitsfaktoren und damit der rechnerischen Ermittlung einer chronischen Toxizität dar. Für 20 im Fischtest geprüfte Stoffe wurde das Konzentrationsverhältnis von $LC_{50}/96\text{ h}$ und NOEC berechnet. Es zeigte sich hierbei, daß allein um die Schwankungsbreite verschiedener Laborergebnisse bezüglich der Atrazin-NOEC abzudecken, ein Sicherheitsfaktor von >100 nötig ist (NOEC beim Zebrafisch = $0,02 - 2,13\text{ ppm}$). Der Quotient $LC_{50} : \text{NOEC}$ lag für die 20 im Fischtest geprüften Stoffe zwischen 0,7 und 3370. Es zeigten sich also erhebliche stoffspezifische Schwankungen. Der für Atrazin ermittelte Quotient beträgt 1850.

Auf die Regenbogenforelle bezogen, ergibt sich bei Anwendung des Sicherheitsfaktors 1850 ein NOEC-Wert zwischen 2,4 und $14\text{ }\mu\text{g/l}$ ($LC_{50}/96\text{ h} = 4,5 - 26,4\text{ ppm}$). Die Problematik der Übertragung von Toxizitätsdaten zwischen Tieren verschiedener Stämme wird durch Tabelle 6 deutlich.

Tabelle 6: Atrazin-Toxizitätsdaten aus Daphnientest und Fischtest im Vergleich (Konzentrationen in ppm)

	$LC_{50}/96\text{ h}$	NOEC/14 d	$\frac{LC_{50}}{NOEC}$
Daphnientest	>65	3,0	21,6
Fischtest	37	0,02	1850

(nach RUDOLPH, 1986)

Zwar liegen die LC_{50} -Werte beider Spezies in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich; die im verlängerten Toxizitätstest ermittelten NOEC-Werte unterscheiden sich jedoch um den Faktor 150. Dies verdeutlicht, daß der für eine Spezies aus LC_{50} - und NOEC-Wert errechnete "Sicherheitsfaktor" nicht auf eine andere Spezies übertragen werden darf (RUDOLPH, 1986).

Die Auffassungen über Notwendigkeit und Höhe von Sicherheitsfaktoren bei der Gefahrenabschätzung von Schadstoffen sind also "extrem differierend" (GODE, 1980). Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß zur Planung und Durchführung verlängerter Toxizitätstests Informationen und Daten vorangegangener akuter Toxizitätstests vorliegen müssen (HERBST, 1985). Diese Forderung nach Vorinformationen ist besonders unter dem Aspekt des Tierschutzes zu verstehen. Auch nach den Prüfvorschriften für den "Verlängerten Toxizitätstest beim Zebrafisch" (RUDOLPH, 1986) ist das Vorliegen von Werten aus dem akuten Toxizitätstest Grundvoraussetzung für die Durchführung weiterer Versuche.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Versuchsbeschreibung

1.1 Rahmenbedingungen

1.1.1 Prüfvorschriften

Zur Ermittlung der langfristigen Toxizität von Atrazin wurde folgende Testserie durchgeführt:

1. Kurzzeittest (Dauer: 48/96 h)
2. Langzeittest I (Dauer: 28 d)
3. Langzeittest II (Dauer: 14 d)

Die Versuchsdurchführung des Kurzzeittests sowie des Langzeittests I folgte den Anleitungen zum "Zebrabärblingstest" ("Verfahrensvorschlag zur Entwicklung ökotoxikologischer Testverfahren im aquatischen Bereich", RUDOLPH 1986). Im Langzeittest II kam ein eigenes Verfahren zur Anwendung.

1.1.2 Stammlösungs-Herstellung

Für die Experimente stand technisches Atrazin (99,5 % Reinheit) zur Verfügung; es wurde unter ständigem Rühren in Siedehitze gelöst und anschließend im Wasserbad auf eine Temperatur von 10°C abgekühlt. Die Lösung wurde membranfiltriert (0,2 µm Sartorius^(R) Membranfilter) und in Braunglasflaschen aufbewahrt. Die Konzentrationen dieser Stammlösungen wurden gaschromatographisch bestimmt. Bei längerer Aufbewahrung der Stammlösungen wurden die Messungen unmittelbar vor einer neuerlichen Anwendung wiederholt.

1.1.3 Versuchstiere

Alle Versuchstiere stammten aus Beständen der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung / Versuchsanlage Wielenbach. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde vor Versuchsbeginn im

Rahmen einer pathologisch-parasitologischen Untersuchung überprüft. Jeweils 14 Tage vor Versuchsbeginn erfolgte eine gegen Ektoparasiten gerichtete prophylaktische Behandlung der Tiere. Hierzu wurden die Forellen wenige Sekunden lang (bis zum "Umkippen") in 8 %iger Kochsalzlösung gebadet.

1.1.4 Hälterungsbedingungen

Die in den verschiedenen Versuchen verwendeten Prüfgefäße, angewendete Testverfahren sowie Wasserdurchflußmengen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Hälterungsbedingungen in Kurzzeit- und Langzeittest

	Prüfgefäß	Testverfahren	Wasserdurchsatz (l/h)
Kurzzeittest	36 l Vollglas	statisch	/
Langzeittest I	36 l Vollglas	Durchfluß	2 l/h
Langzeittest II	90 l Vollglas	Durchfluß	3 l/h

1.1.5 Wassertemperatur

Durch Installation einer Klimaanlage (Wechner Kältetechnik^(R)) im Versuchsraum war die Aufrechterhaltung einer Wassertemperatur von $10,5 \pm 0,5$ °C während der Gesamtdauer der Versuchsdurchführungen möglich.

1.1.6 Sauerstoffgehalt des Wassers

Das Versuchswasser wurde jeweils vor dem Fischbesatz der Testbecken bis zum Sauerstoff-Sättigungswert belüftet. Während der Versuchsdurchführungen wurde gerade so stark belüftet, daß 60 % der maximal möglichen Sauerstoffsättigung nicht unterschritten wurden.

1.1.7 Lichtverhältnisse

Die Lichtverhältnisse wurden einem Tag/Nacht-Rhythmus mit einer Hellphase von 12 Stunden und einer Dämmerungsperiode von 20 Minuten angepaßt.

Um Schreckreaktionen der Tiere auf Umgebungsreize zu vermeiden (z.B. Bewegungen des Versuchsbetreuers), wurden die Testbecken mit dunklen Glasplatten abgedeckt und zusätzlich die Frontseiten mit einer undurchsichtigen Kunststofffolie beklebt.

1.1.8 Wasseruntersuchung

Durch die Analyse von Wasserproben jeweils zu Beginn, in der Mitte und am Ende eines Versuches, wurde sichergestellt, daß die eingestellten Atrazinkonzentrationen 80 % des Ausgangswertes nicht unterschritten.

1.1.9 Entsorgung des Testwassers

Die Entsorgung des Testwassers erfolgte mittels zweier hintereinandergeschalteter Aktivkohlefilter.

1.2 Kurzzeittest

1.2.1 Testfische

Es wurden Regenbogenforellen ($n = 50$) mit einem Gewicht von $6,0 \pm 1,9$ g und einer Körperlänge von $7,8 \pm 2,0$ cm verwendet.

1.2.2 Versuchsbedingungen

Zur Herstellung der Prüfansätze wurde rekonstituiertes Wasser mit folgender Zusammensetzung verwendet:

294 mg CaCl_2 * 2 H_2O
123 mg MgSO_4 * 7 H_2O
64,75 mg NaHCO_3
5,75 mg KCl

ad 1000 ml Aqua dest.

Das Wasser wurde während der Gesamtversuchsdauer nicht erneuert (sogenanntes "Statisches Verfahren").

1.2.3 Versuchsdurchführung

In einer 48stündigen Adaptationsphase wurden die Testfische an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Einen Tag vor Einstellung der Testkonzentrationen wurde die Fütterung ausgesetzt.

Es wurden die Atrazinkonzentrationen 1,4 ppm und 2,8 ppm geprüft. Jede Konzentrationsstufe wurde im Doppelansatz getestet, wobei jedes Becken mit 10 Fischen besetzt wurde. Zusätzlich wurde ein Kontrollbecken ohne Prüfsubstanz mit ebenfalls 10 Fischen angesetzt.

Eine Bestimmung der Wasserparameter Sauerstoffsättigung, Temperatur und pH-Wert erfolgte zu Versuchsbeginn sowie alle 12 Stunden.

Die Fische wurden nach 3, 24, 48 und 96 Stunden beobachtet.

Aus jedem Ansatz wurden insgesamt 7 Tiere für die nachfolgenden toxikologischen Untersuchungen verwendet. Dabei wurden die Kontrolltiere nach 96 Stunden entnommen. Aus den anderen Ansätzen wurden jeweils 3 Tiere nach 48 Stunden, weitere 4 Tiere nach 96 Stunden untersucht. Die restlichen 3 Fische aus jedem Becken wurden zur Rückstandsanalytik verwendet.

1.2.4 Betäubung

Die Tiere wurden vorsichtig gefangen, um Fangstreß zu vermeiden, und mit 1,1,1 Trichlor-2-methyl-2-propanol (Merck) betäubt (Dosierung: 1 g/l Wasser).

1.2.5 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus den Kaudalgefäßen nach Amputation des Schwanzstieles. Die ersten Blutstropfen wurden verworfen, um Gewebsfragmente zu entfernen. Das austretende Blut wurde direkt in heparinisierte Mikrokapillaren aufgezogen.

1.3 Langzeittest I (28 Tage)

1.3.1 Testfische

Es wurden Regenbogenforellen ($n = 100$) mit einem Gewicht von $14,1 \pm 2,3$ g und einer Körperlänge von $10,0 \pm 1,8$ cm verwendet.

1.3.2 Versuchsbedingungen

Für en Langzeittest stand Wielenbacher Quellwasser zur Verfügung, dessen physikalische und chemische Durchschnittswerte Tabelle 8 zu entnehmen sind.

Tabelle 8: Chemische und physikalische Durchschnittswerte des Quellwassers

Temperatur (°C)	9,4
pH-Wert	7,66
Sauerstoffgehalt (mg/l)	10,5
BSB ₅ (mg/l)	0,8
CO ₂ (mg/l)	14,9
CSB (mg/l)	6,3
Leitfähigkeit (µS)	744

Von einem Hochbehälter im Versuchsraum bis zur Verteilung an die einzelnen Prüfansätze erfolgte die Wasserführung in einem nach außen abgeschlossenen Leitungssystem. Ein konstanter Wasserdruck wurde durch Umwälzpumpen (Badu 40^(R), Pumpen Schall) aufrechterhalten. In die Gesamtfließstrecke sind Wasseraufbereitungsgeräte in nachstehender Reihenfolge integriert:

1. Wasserkaskade

Die Wasserkaskade dient einerseits einer Anreicherung des Verdünnungswassers mit Sauerstoff, andererseits verringert sie den Gehalt des Wassers an freier Kohlensäure. Durch diese Aufbereitungsmaßnahme sollte die Entstehung der sogenannten "Gasblasenkrankheit" (MOHR, 1984) verhindert werden.

2. UV-Entkeimungsanlage (Thyssen Wassertechnik GmbH)

3. Aktivkohlefilter (Aquapur^(R), Thyssen)

Durch die Verwendung eines Aktivkohlefilters sollten vor allem gegebenenfalls im Quellwasser vorhandene Pestizidrückstände oder andere chemische Kontaminanten zurückgehalten werden.

Durch die in die Zuleitungsrohre integrierten Meßfühler (WTW, Weilheim) konnten die Wasserparameter Temperatur, Sauerstoffsättigung, pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit kontrolliert werden. Die Messungen erfolgten unmittelbar vor der Verteilung des Verdünnungswassers an die Prüfansätze, wobei die Meßwerte über einen Prozeßschreiber (Logoprint^(R), Juchheim GmbH) im 6-Stunden-Intervall aufgezeichnet wurden.

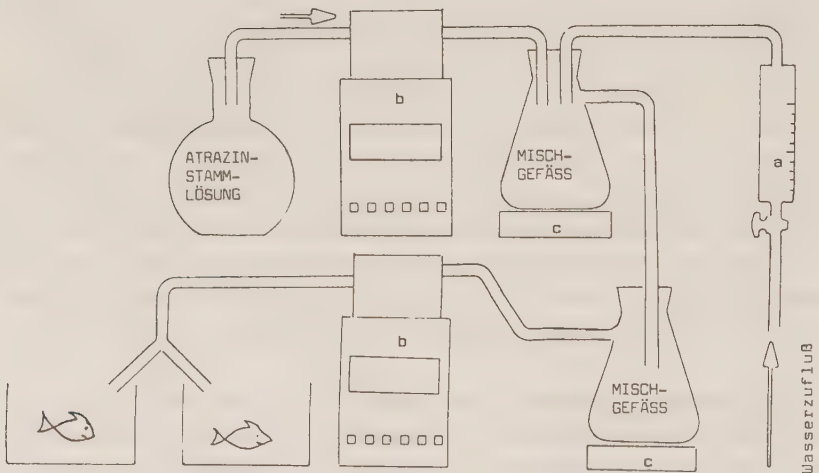
Die Konzentrationseinstellung erfolgte durch die Kombination von Wasserdurchflußmessern (Rotamesser^(R), Dr. Hennig GmbH) mit Präzisionsschlauchpumpen (Minipuls^(R), Abimed). Stammlösung und Verdünnungswasser wurden mit einem Magnetrührwerk ständig durchmischt. Zur Absicherung der gleichmäßigen Durchmischung wurde das Testwasser in ein zweites Mischgefäß geleitet und von dort durch eine weitere Schlauchpumpe auf die 2 Becken eines Doppelansatzes verteilt.

Die gleichmäßige Verteilung des Testwassers im Prüfgefäß wurde in einem Vorversuch durch eine optische Darstellung der Strömungsverhältnisse mit dem Farbstoff Uranin überprüft.

Förder- und Transportschläuche der Pumpen sowie alle anderen mit dem Testwasser in Berührung kommenden Teile der Prüfeinrichtungen bestehen aus chemisch inerten Materialien wie Viton, PTFE (Teflon^(R)) oder Glas.

Abbildung 2 zeigt Versuchsanordnung und Geräte eines Doppelprüfansatzes.

Abbildung 2: Versuchsanordnung und Geräte eines Doppelprüfansatzes



Erläuterung zu Abb. 2: a = Wasserdurchflußmesser
b = Präzisionsschlauchpumpen
c = Magnetrührwerk

1.3.3 Versuchsdurchführung

In einer einwöchigen Adaptationszeit wurden die Fische an die Testbedingungen gewöhnt. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich mit pelletiertem Handelfutter (Trouvit^(R)), wobei die Futtermenge etwa 2 % in bezug auf das ursprüngliche Fischgewicht betrug. Futter- und Kotreste wurden zweimal täglich mit einem Glasrohr abgesaugt.

Es wurden 4 Atrazinkonzentrationen im Doppelansatz sowie ein Doppelkontrollansatz geprüft (10 Fische / Becken). Ausgehend von dem im Fischtest nach dem Chemikaliengesetz ermittelten NOEC (no observed effect concentration) -Wert für Zebraabärblinge (Dauer: 28 Tage), die je nach Untersuchungslabor in einem Bereich zwischen 0,02 und 0,95 ppm lagen, wurde die höchste Konzentrationsstufe auf 0,08 ppm festgelegt. In absteigender geometrischer Reihe lagen die Atrazinkonzentrationen der anderen Prüfansätze bei 0,04, 0,02 und 0,01 ppm.

Die Beobachtung der Tiere erfolgte nach 2, 6 und 12 Stunden am ersten Tag sowie mindestens zweimal täglich an allen weiteren Prüftagen.

Von jedem Doppelansatz wurden 10 Forellen für die eigenen Untersuchungen verwendet (5 aus jedem Prüfbecken). Von den restlichen 10 Tieren wurden je 5 für die Rückstandsanalytik, weitere 5 Tiere für elektronenmikroskopische Untersuchungen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, verwendet.

1.3.4 Betäubung und Blutentnahme

Betäubung und Blutentnahme erfolgten in analoger Weise zum Kurzzeittest.

1.4 Langzeittest II

1.4.1 Testfische

Es wurden Regenbogenforellen ($n = 40$) mit einem Gewicht von 132 ± 21 g und einer Körperlänge von $21,8 \pm 1,9$ cm verwendet.

1.4.2 Versuchsbedingungen

Die Qualität des Verdünnungswassers entsprach dem des Langzeitversuchs I. Die Herstellung der Testkonzentrationen erfolgte durch Mischung entsprechender Volumenanteile Atrazin-Stammlösung mit dem Verdünnungswasser in einem 90-Liter-Glasbecken, das jeweils zwischen zwei Becken eines Doppelprüfansatzes aufgestellt wurde und zugleich als Vorratsbehälter für das Testwasser diente. Über eine Schlauchpumpe mit zwei Pumpenköpfen (Favorit 5000^(R), Deuster) wurde das Testwasser aus dem Vorratsbehälter auf die zwei Prüfbecken eines Doppelanatzes verteilt. Zusätzlich wurde das bei jedem Reinigungsvorgang entnommene Wasser aus dem Vorratsbehälter substituiert (etwa 20 Liter pro Reinigungsvorgang).

1.4.3 Versuchsdurchführung

Es wurden 3 Konzentrationsstufen bei einer Expositionszeit von 14 Tagen geprüft. Für die Auswahl der Testkonzentrationen lagen die vorläufigen Testergebnisse aus dem Langzeittest I als Orientierungsgrundlage vor. Es wurden die Konzentrationen 0,04, 0,02 und 0,01 ppm geprüft. Die Versuche liefen im Doppelanatz, wobei jedes Becken mit 5 Fischen besetzt wurde. Die Beobachtung der Tiere erfolgte nach 2, 6 und 12 Stunden am ersten Tag sowie alle 12 Stunden an allen weiteren Prüftagen.

1.4.4 Betäubung

Die Tiere wurden vorsichtig gefangen, um Fangstreß zu vermeiden und anschließend mit 0,007 %iger Tricain-Methan-Sulfonat-Lösung (MS 222^(R), Sandoz) betäubt.

1.4.5 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte ausschließlich durch Herzpunktion. Hierzu wurden heparinisierte Einmal-Injektionskanülen (0,8 x 40 mm) mit aufgesetzter Einmalspritze (1,0 ml, heparinisiert) verwendet. Anschließend wurde das Blut in heparinisierte Eppendorfgefäße gefüllt und mehrmals vorsichtig gekippt. Die durchschnittlich gewonnene Blutmenge betrug etwa 1,5 - 2,0 ml.

1.4.6 Plasmagewinnung

Die Blutproben wurden 5 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert und anschließend das Plasma mit einer Kanüle abgezogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Plasmaproben bei -20°C (bis maximal 2 Tage) aufbewahrt.

2. Untersuchungsmethoden

Eine Gesamtübersicht aller durchgeführten Untersuchungen zeigt Tabelle 9.

2.1 Klinische Beobachtung

Bei der klinischen Beobachtung wurden folgende Parameter bewertet:

1. Motilität
2. Raumverhalten
3. Gleichgewichtssinn
4. Pigmentierung (Verfärbung)
5. Atemfrequenz
6. Kotkonsistenz
7. Schreckhaftigkeit
8. Futteraufnahme (nur bei Langzeitversuch I und II)

Festgestellte Veränderungen der einzelnen Parameter beziehen sich jeweils auf Beobachtungen in den Kontrollbecken, die als Vergleichsmaßstab dienten.

Tabelle 9: Gesamtübersicht der durchgeführten Untersuchungen

Material und Methoden	Testfische (Länge u. Gewicht)	Atrazin-Konzentration	Klinische Beobachtung	Pathologie / Histologie *	HÄMATOLOGIE						PLASMA-ENZYM-BESTIMMUNG		
					Hk	Hb	Ery-gesamtzahl	MCH	MCV	Messungen an Erythrozyten		MCHC	
Testverfahren	Kurzzeittest (48 / 96 h)	Rf G: 6,0 g L: 7,8cm	X	X	X	X				X			
Langzeittest I (28 Tage)	Rf G: 14,1 g L: 10,0cm	0,08 0,04 0,02 0,01	X	X	X	X				X			
Langzeittest II (14 Tage)	Rf G: 132 g L: 21,8cm	0,04 0,02 0,01	X	X	X	X	X	X	X	X			GOT / GPT GLDH / AP LDH / CK HBDH

* Ergebnisse werden nicht in der vorliegenden Arbeit dargestellt

2.2 Blutuntersuchung

2.2.1 Kurzzeit- und Langzeittest I

Von jedem Tier wurde der Hämatokritwert nach der Mikromethode (Compur M 1101^(R), Minizentrifuge) bestimmt sowie ein Blutaussstrich angefertigt. Die Färbung der Blutaussstriche erfolgte nach der Diff-Quick^(R)-Methode (HOFFMANN et al., 1978). An den Blutaussstrichen wurden Längs- und Querdurchmesser sowie die Flächen von Gesamtzelle und Zellkern an je 30 Erythrozyten gemessen*. Zusätzlich wurde für jedes Tier das Kern/Plasma-Verhältnis ($V_{K/P}$) durch Division der Mittelwerte bestimmt.

2.2.2 Langzeittest II

Von jeder Einzelblutprobe wurden folgende Parameter bestimmt:

- Erythrozytenzahl: Die Auszählung erfolgte nach dem Verfahren von NATT und HERRICK (1952)
- Hämatokrit (Hk)
- Hämoglobin (Hb_E): Die Messung erfolgte nach der Hämoglobin-cyanid-Methode (Compur M 1000^(R) Miniphotometer).
- MCV: (mean corpuscular volume)
- MCH: (mean corpuscular hemoglobin)
- MCHC: (mean corpuscular hemoglobin concentration)

* Die Messungen an den Erythrozyten erfolgten mit einem Computer PET 3001^(R) der Firma Leitz

2.2.3 Auswertung

Aus den Einzelfischwerten des jeweiligen Prüfparameters wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung für jede Testkonzentration berechnet. Die statistische Auswertung der Differenzen erfolgte mit dem Student-t-Test.

2.3 Plasmaenzymuntersuchung

Die Aktivitätsbestimmung der Plasmaenzyme erfolgte nach den Mikroliter- und Halbmikromethoden der Firma Boehringer, Mannheim, in einem Hitachi 705 Analyzer*.

Es wurden die Aktivitäten folgender Enzyme bestimmt:

- | | |
|------------------------------------|--------|
| - Glutamat-Oxalacetat-Transaminase | (GOT) |
| - Glutamat-Pyruvat-Transaminase | (GPT) |
| - Glutamat-Dehydrogenase | (GLDH) |
| - Alkalische Phosphatase | (AP) |
| - Hydroxy-Butyrat-Transaminase | (HBDH) |
| - Creatinkinase | (CK) |
| - Laktat-Dehydrogenase | (LDH) |

Aus den Meßwerten der Einzelproben wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung für die einzelnen Testkonzentrationen berechnet und statistisch ausgewertet.

2.4 Pathologische und histopathologische Untersuchung

Unmittelbar nach der Blutentnahme erfolgte eine Sektion der Forellen. Die Organe der Tiere wurden im Ganzen herauspräpariert, in 6 %igem Formalin fixiert und in Paraplast^(R) eingebettet. Es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Leitz Universal-Mikroskop.

* Für die Möglichkeit der Benutzung des Autoanalyzers danke ich Herrn Prof. Dr. W. KRAFT, Med. Tierklinik der Universität München

IV. ERGEBNISSE

1. Kurzzeittest (48 und 96 h)

1.1 Klinische Befunde

1.1.1 Atrazinkonzentration: 1,4 ppm

- 3 h: Schreckhaftigkeit und Motilität der Tiere sind deutlich reduziert; die Atemfrequenzen sind mittelgradig erhöht (s. Tabelle 10 und Abbildung 3). Eine geringgradige diffuse Dunkelverfärbung der Haut ist festzustellen.
- 24 h: Die Motilität der Fische hat sich weiter vermindert; die Dunkelfärbung der Haut zeigt eine noch deutlichere Ausprägung. Ein weiterer Anstieg der Atemfrequenzen ist festzustellen. Aus dem After der Tiere hängen 1-2 cm lange, weißliche Gebilde, die bereits in großen Mengen auf dem Boden der Prüfgefäße zu finden sind. Bei der histologischen Untersuchung erwiesen sich diese Ausscheidungen als vorwiegend aus Fibrin und Darmepithelzellen bestehend.
- 48 h: Zu den bereits dargestellten Symptomen tritt ein verändertes Raumverhalten der Tiere, die sich jetzt vorwiegend in Bodennähe und in den Ecken der Prüfgefäße aufhalten. Die Atemfrequenzen sind leicht rückläufig.
- 96 h: Apathie und verminderte Schreckhaftigkeit der Tiere zeigen stärkste Ausprägung, während die Atemfrequenzen weiter absinken.

1.1.2 Atrazinkonzentration: 2,8 ppm

- 3 h: Motilität und Schreckhaftigkeit der Tiere sind stark reduziert; die Atemfrequenzen hochgradig erhöht (s. Tabelle 10 und Abbildung 3). Eine stark ausgeprägte Dunkelverfärbung der Haut ist festzustellen.
- 24 h: Bei 2 Tieren sind deutliche Gleichgewichtsstörungen festzustellen (Stehen mit dem Kopf nach unten).

Die übrigen Tiere zeigen eine Änderung des Raumverhaltens, wie es auch bei den Tieren der 1,4 ppm Prüfansätze zu beobachten war. Motilität und Schreckhaftigkeit sind weiter herabgesetzt; selbst auf Berührungsreize hin zeigen die Forellen keine Fluchtreaktionen mehr. Die Atemfrequenzen sind weiter angestiegen. In noch größerem Ausmaß als bei dem 1,4 ppm Testansatz scheiden die Tiere Fibrin und Darmepithelzellen aus.

-48 h: Bei etwa zwei Dritteln der Fische ist ein beidseitiger Exophthalmus festzustellen. Die Atemfrequenzen zeigen wieder abnehmende Tendenz.

-96 h: Alle Forellen zeigen deutlichen, beidseitigen Exophthalmus; die Atemfrequenzen nehmen weiter ab.

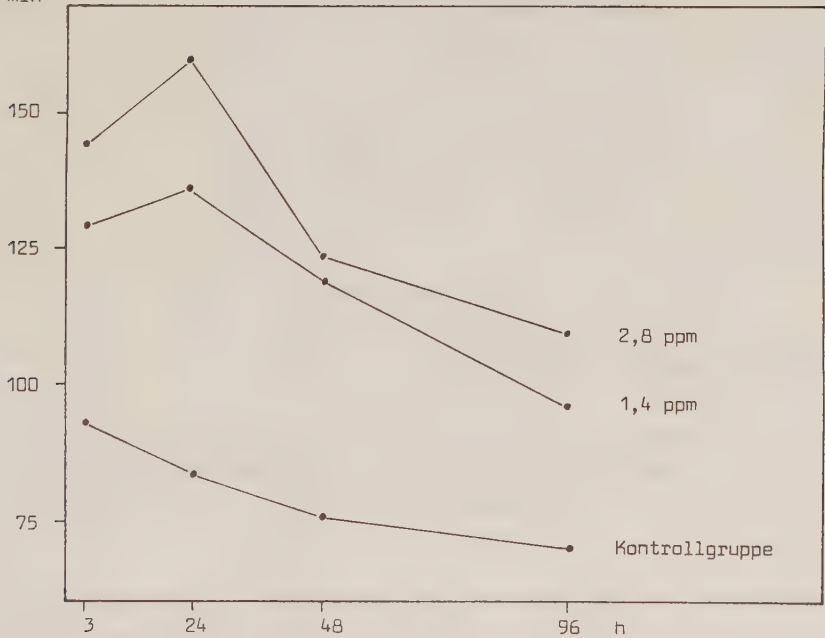
Tabelle 10: Atemfrequenzen der Versuchstiere 3, 24, 48 und 96 Stunden nach Atrazinexposition
(angegeben sind Maximalwerte)

Testkonzentration	Atemfrequenz			
	3 h	24 h	48 h	96 h
Kontrolle	92	84	76	68
1,4 ppm	128	136	120	96
2,8 ppm	144	160	124	108

Abbildung 3: Atemfrequenz-Änderung im zeitlichen Verlauf

Atemfrequenz /

min



1.2 Hämatologische Befunde

1.2.1 Hämatokrit

Die Hämatokritwerte der Fische beider Testkonzentrationen zeigen deutliche Abnahmen (Tabelle 11), wobei die niedrigsten Werte im 2,8 ppm Testansatz festzustellen sind.

Tabelle 11: Hämatokritwerte ($\bar{x}$; s) für die Testkonzentrationen 1,4 und 2,8 ppm (in vol%).

Testkonzentration (ppm)	Hk	
	$\bar{x}$	s
Kontrolle/96 h	39,7	4,5
1,4/48 h	36,0	2,8
1,4/96 h	35,5	3,6
2,8/48 h	32,8	2,0
2,8/96 h	34,8	2,5

1.2.2 Erythrozytenmessungen

Die Meßwerte für Flächen, Längs- und Querdurchmesser der Erythrozyten sowie der Kernflächen sind in Tabelle 12 aufgeführt, die Erythrozyten-Querdurchmesser und Kernflächen außerdem in Abbildung 4 und 5 dargestellt.

Bezüglich der Längsdurchmesser der Erythrozyten können keine Veränderungen festgestellt werden, während in beiden Testkonzentrationen sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden eine deutliche Zunahme der Erythrozyten-Querdurchmesser nachzuweisen ist. Bei den Zellkernen lassen sich für beide Versuchskonzentrationen deutliche Flächenabnahmen sichern, wobei die niedrigsten Werte nach jeweils 96 Stunden auftreten. Mit Ausnahme des 2,8 ppm-Versuches, für den eine deutliche Zunahme der Erythrozytenflächen nach 48 Stunden festzustellen ist, treten bei den Erythrozytenflächen keine deutlichen Veränderungen auf. Für das Verhältnis $F_K:F_E$ ist eine Verringerung des Quotienten sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden für beide Versuchskonzentrationen festzustellen.

Tabelle 12: Werte der Längen- und Flächenmessung an Erythrozyten
und Erythrozytenkernen (Kurzzeitversuch)

Testkonzentration (ppm)	Erythrozyten				Kerne		$\frac{F_K}{F_E}$			
	Längsdurchmesser (μm)		Querdurchmesser (μm)		Fläche (F_K)					
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s				
Kontrolle/96h	23,68	0,69	14,28	0,66	95,97	4,75	21,95	1,04	0,22	0,009
1,4/48 h	23,31	0,93	15,18	0,51	98,16	5,74	21,01	0,86	0,21	0,006
1,4/96 h	22,96	0,94	14,82	0,51	94,14	6,83	18,13	5,50	0,21	0,018
2,8/48 h	23,87	0,81	15,20	0,41	103,22	3,55	21,65	1,66	0,20	0,022
2,8/96 h	23,93	0,81	15,24	0,51	94,90	3,45	20,51	1,22	0,21	0,010

Abbildung 4: Querdurchmesser der Erythrozyten für die Testkonzentrationen 1,4 und 2,8 ppm ($\bar{x}$; s)

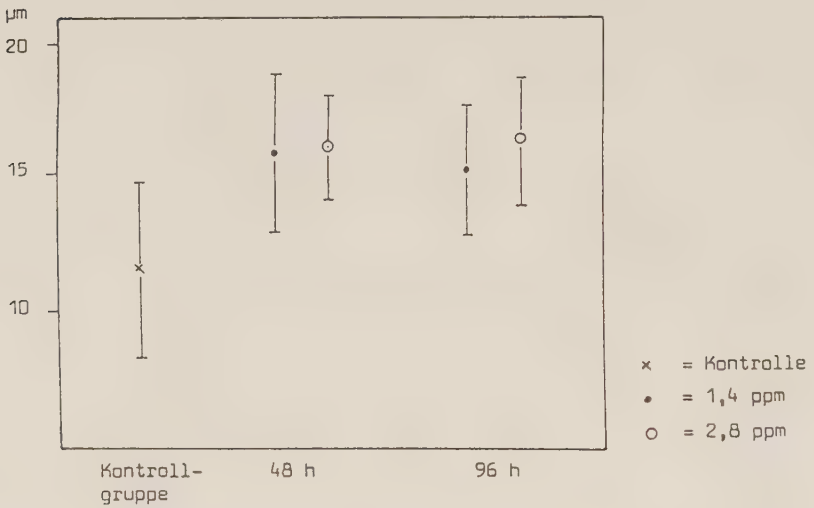
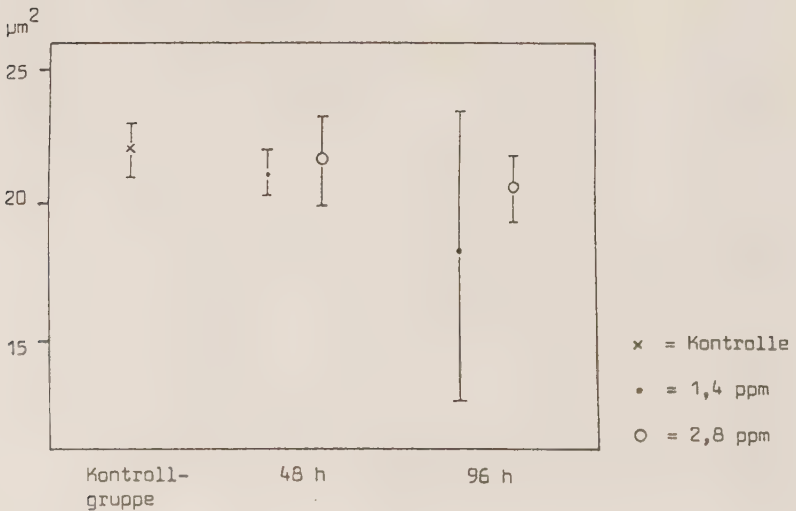


Abbildung 5: Fläche der Erythrozytenkerne für die Testkonzentrationen 1,4 und 2,8 ppm ($\bar{x}$; s)



1.3 Pathologisch-anatomische und histologische Befunde

Eine ausführliche Darstellung der pathologisch-anatomischen und histologischen Ergebnisse ist durch NEGELE und EWRINGMANN in Bearbeitung. Den Ergebnissen wird hier nur insoweit vorgegriffen, wie sie zur Interpretation der hämatologischen und enzymatischen Ergebnisse dienen.

Haut: Vermehrte Schleimabsonderung in beiden Prüfkonzentrationen.

Kiemen: Für beide Konzentrationsstufen ist eine Anämie der Kiemen festzustellen, wobei die deutlichste Ausprägung im 2,8/96 h-Versuch auftritt. Histologisch ist eine Hyperplasie der Lamellenbasen sowie eine Ödematisierung der Sekundärlamellen festzustellen. Im Bereich der Sekundärlamellen sind Teleangiektasien in unterschiedlichem Ausmaß zu beobachten.

Magen-Darm-Trakt: In beiden Versuchskonzentrationen treten vereinzelt hochgradige Ödematisierungen der Magenwände auf, die histologisch in der Submucosa lokalisiert werden können.

Leber: Eine Anämie des gesamten Organs mit zunehmender Ausprägung in der höheren Testkonzentration ist festzustellen. Histologisch sind Einzelzell- und Zellgruppennekrosen, insbesondere im Umfeld von Zentralvenen zu diagnostizieren.

Milz: Im 1,4/96 h- sowie 2,8/48- und 96-h-Versuch treten bei einigen Tieren punktförmige schwärzliche Flekungen der Milz auf.

Herz: Für beide Konzentrationen ist eine deutliche Anämie des Myokards festzustellen.

Schwimmbase: Zahlreiche Fische beider Testkonzentrationen zeigen eine deutliche Ödematisierung der Schwimmbase sowie Petechien und Ekchymosen der Schwimmbasenwand in unterschiedlichem Ausmaß.

2. Langzeittest I (28 Tage)

2.1 Klinische Befunde

Klinische Veränderungen konnten nur für die höchste geprüfte Konzentration nachgewiesen werden (0,08 ppm). Ab dem 6. Versuchstag nach Atrazinzusatz wurde eine leicht reduzierte Schreckhaftigkeit deutlich, die sich im weiteren Versuchsverlauf noch deutlicher ausprägte.

Eine geringgradige diffuse Dunkelverfärbung der Haut war ab dem 8. Versuchstag zu beobachten.

Ab dem 9. Versuchstag ist eine Motilitätseinschränkung der Tiere zu beobachten, deren Ausprägung sich mit länger werdender Versuchsdauer verstärkte.

Ein gestörter Gleichgewichtssinn trat bei einer Forelle am 13. Versuchstag auf; das Tier befand sich nicht mehr in physiologischer Schwimmposition, sondern war deutlich um die Längsachse zur Seite geneigt.

2.2 Hämatologische Befunde

2.2.1 Hämatokrit

Für die Testkonzentrationen 0,02, 0,04 und 0,08 ppm lassen sich deutliche Abnahmen der Hämatokritwerte statistisch sichern, wobei die niedrigsten Werte beim 0,04 ppm-Prüfansatz auftreten (Tabelle 13 und Abbildung 6).

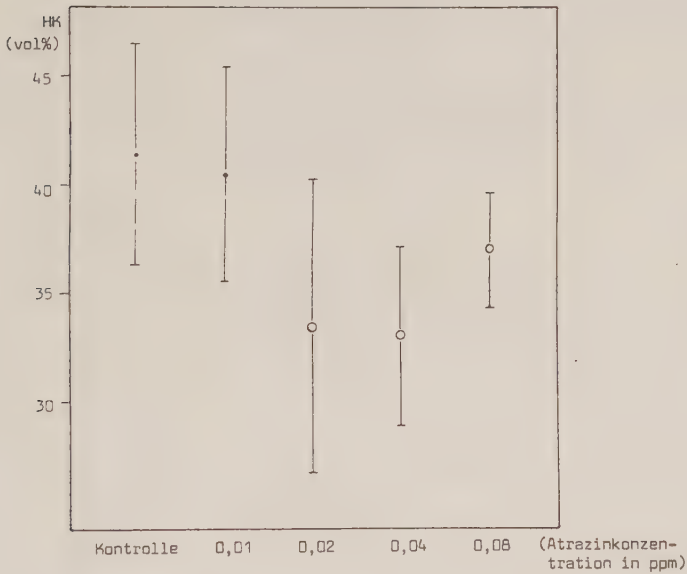
Tabelle 13: Hämatokritwerte ($\bar{x}$; s) nach 28tägiger Atrazinexposition (in vol%)

Testkonzentration	Hk $\bar{x}$	s
Kontrolle	41,3	5,2
0,01 ppm	40,4	5,0
0,02 ppm	33,5**	6,9
0,04 ppm	33,0**	4,2
0,08 ppm	37,0*	2,8

Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe: * p < 0,05

** p < 0,01

Abbildung 6: Hämatokritwerte ($\bar{x}$; s) nach 28tägiger Atrazinexposition



○ = statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe

2.2.2 Erythrozytenmessungen

Die Meßwerte für Flächen, Längs- und Querdurchmesser der Erythrozyten sowie der Kernflächen sind in Tabelle 14 aufgeführt, die Erythrozyten-Querdurchmesser zusätzlich in Abbildung 7 dargestellt.

Für die Längsdurchmesser der Erythrozyten sind deutliche Differenzen zur Kontrollgruppe nicht zu beobachten. Dagegen kann eine Abnahme der Erythrozyten-Querdurchmesser für alle Testkonzentrationen statistisch gesichert werden. Bei den Flächenmessungen ergibt sich eine Abnahme der Gesamtfläche bis 0,04 ppm,

Tabelle 14: Werte der Längen- und Flächenmessung an Erythrozyten und Erythrozytenkernen nach 28tägiger Atrazineexposition

Testkonzentration (ppm)	Erythrozyten				Kerne				$\frac{F_K}{F_E}$	
	Längsdurchmesser (μm)	Querdurchmesser (μm)	Fläche (F_E) (μm^2)	Fläche (F_K)	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Kontrolle	24,00	0,51	15,54	0,41	104,39	4,40	21,55	1,09	0,20	0,012
0,01	23,59	0,34	15,07 ^{**}	0,30	101,93	5,00	22,37 [*]	0,90	0,27 ^{**}	0,011
0,02	23,89	0,74	15,17 [*]	0,30	103,04	3,39	22,00	0,59	0,21	0,009
0,04	23,68	5,04	15,23 [*]	0,32	99,92 [*]	4,82	22,03	1,04	0,22 ^{**}	0,013
0,08	24,68	1,95	15,11 [*]	0,61	103,49	4,86	21,98	1,06	0,21	0,011

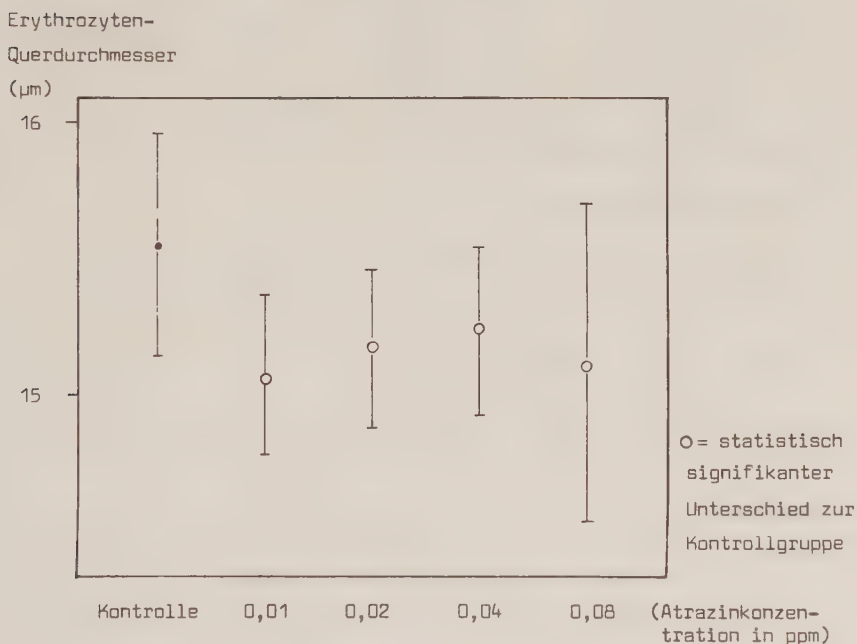
Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe:

* p < 0,05

** p < 0,01

während die Zellflächen in der höchsten geprüften Konzentration wieder ansteigende Tendenz zeigen. Zusätzlich ist eine Vergrößerung der Kernflächen für alle Versuchskonzentrationen festzustellen. Ein deutlicher Anstieg des Verhältnisses $F_K:F_E$ ist ebenfalls in allen Prüfansätzen nachweisbar.

Abbildung 7: Erythrozyten-Querdurchmesser ($\bar{x}$; s) nach 28tägiger Atrazinexposition



2.3 Pathologisch-anatomische und histologische Befunde

Kiemen: Für alle Prüfkonzentrationen ist eine Anämie der Kiemen festzustellen, wobei die Ausprägung im 0,01-ppm-Ansatz deutlich geringer ist als bei den höheren Konzentrationen

Leber: Eine Anämie der Leber ist für alle Versuchskonzentrationen festzustellen.

Histologisch können Einzelzell- und Zellgruppennekrosen diagnostiziert werden, deren Ausmaß proportional zur Konzentrationserhöhung zunimmt.

Milz: Eine Vergrößerung des Organs ist für die Testkonzentrationen 0,04 und 0,08 ppm bei einigen Fischen festzustellen. Außerdem ist eine Hyperämie der Milz mit besonders deutlicher Ausprägung im 0,08 ppm-Versuch zu beobachten.

(Weitere Ergebnisse: s. EWRINGMANN und NEGELE, in Vorbereitung).

3. Langzeittest II (14 Tage)

3.1 Klinische Befunde

In keinem der Prüfansätze konnten klinische Veränderungen beobachtet werden.

3.2 Hämatologische Befunde

Die Meßwerte der hämatologischen Untersuchungen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Während für die 0,01 und 0,02 ppm-Prüfansätze keine Veränderungen feststellbar sind, können für die höchste Testkonzentration (0,04 ppm Atrazin) deutliche Abnahmen der Erythrozytenzahl und Hämatokritwerte nachgewiesen werden (Abbildung 8). Für die Parameter Hämoglobingehalt und MCV (mean corpuscular volume) sind eindeutige Trends nicht festzustellen, während MCH (mean corpuscular hemoglobin)- und MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration)-Werte einen leichten Anstieg erkennen lassen.

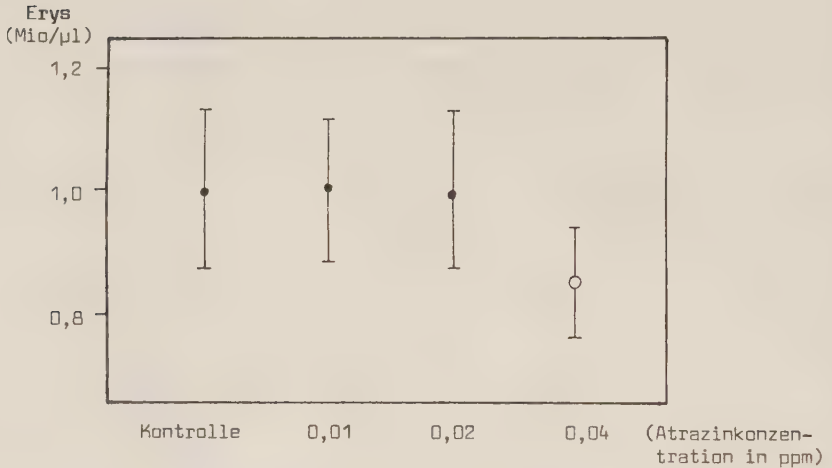
Tabelle 15: Meßwerte der hämatologischen Untersuchungen ($\bar{x}$; s) nach 14tägiger Atrazinexposition

Testkonzen- tration	Erythrozyten- zahl (Mio/ μ l)		Hämatokrit (vol%)		Hämoglobin (g/dl)		MCV (μ m ³)		MCH (pg)		MCHC (g/dl)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Kontrolle	0,99	0,13	37,2	2,7	6,75	1,44	381	62	68,5	21,0	1,83	0,37
0,01 ppm	1,0	0,12	35,9	2,9	7,63	0,70	362	43	77,0	10,1	2,13	0,01
0,02 ppm	0,98	0,13	37,1	3,4	6,81	0,97	383	41	77,9	23,1	1,86	0,25
0,04 ppm	0,85**	0,09	34,2	5,6	6,8	0,58	406	67	80,1	10,6	2,02	0,20

Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe:

** p < 0,01

Abbildung 8: Erythrozytenzahl ($\bar{x}$; s) nach 14tägiger Atrazinexposition



O = statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe

3.3 Enzymaktivitäten im Plasma

Die Meßwerte der Aktivitätsbestimmungen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Statistisch hochsignifikante Veränderungen sind bei 4 von insgesamt 7 Enzymen nachzuweisen. Für die einzelnen Enzyme können folgende Aktivitätsänderungen festgestellt werden:

Tabelle 16: Enzymaktivitäten im Plasma ($\bar{x}$; s) nach 14tägiger Atrazinexposition (Werte in IU/l)

Testkonzentration	GOT		GPT		GLDH		CK		AP		LDH		HBDH	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
Kontrolle	267	28	9,7	1,8	102	27	2166	876	493	163	1090	348	314	76
0,01 ppm	294	53	11,0	1,5	108	24	1605	803	562	157	1116	260	396	113
0,02 ppm	328*	67	10,7	2,8	89	22	3383*	1123	482	133	1227	519	402	159
0,04 ppm	351**	50	13,4**	3,2	72**	13	1252	1548	705**	95	1785	1463	342	166

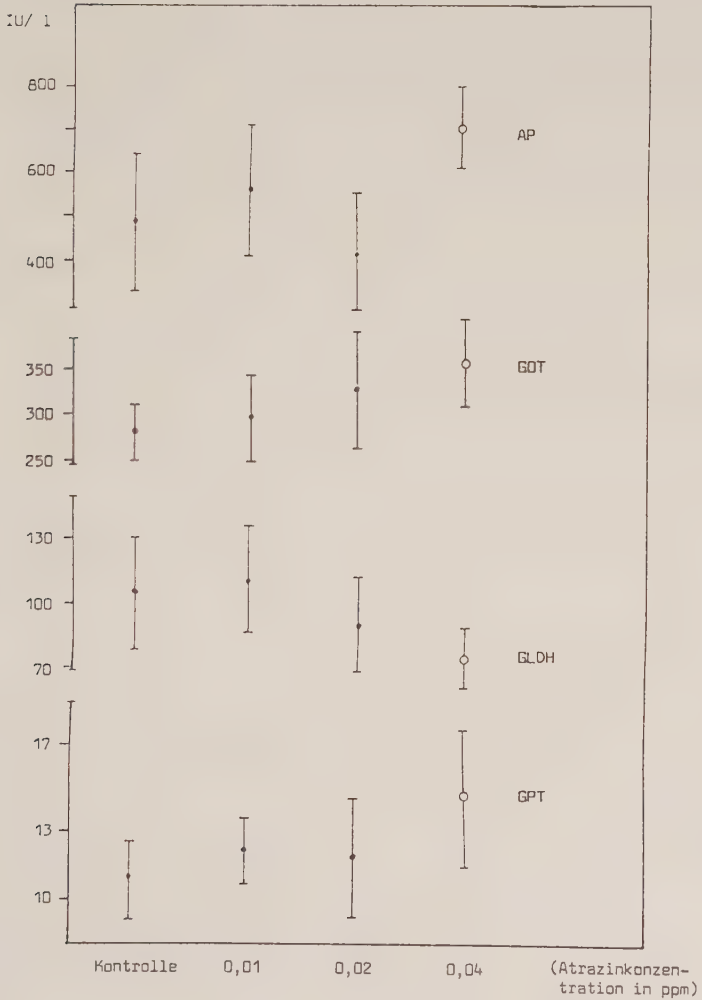
Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe:

* p < 0,05

** p < 0,01

- GOT:** Die GOT zeigt deutlich proportional zu den Konzentrationserhöhungen in den Prüfansätzen ansteigende Plasmaaktivitäten (Abbildung 9).
- GPT:** Erhöhungen des GPT-Plasmaspiegels sind für alle Testkonzentrationen festzustellen, wobei die höchsten Aktivitäten im 0,04 ppm-Prüfansatz gemessen wurden (13,4 IU/l). Geringere Aktivitätserhöhungen sind für die Testkonzentrationen 0,01 und 0,02 ppm festzustellen (11,0 bzw. 10,7 IU/l) (Abbildung 9).
- GLDH:** Die GLDH zeigt deutliche Plasmaaktivitätsverluste für die Konzentrationsstufen 0,02 und 0,04 ppm (89 bzw. 72 IU/l, während für den 0,01 ppm-Prüfansatz (108 IU/l) keine deutliche Abweichung vom Kontrollwert (102 IU/l) festzustellen ist (Abbildung 9).
- AP:** Statistisch läßt sich eine Aktivitätserhöhung der AP für den 0,04 ppm-Prüfansatz sichern. Für die Testkonzentrationen 0,01 und 0,02 ppm sind dagegen konzentrationsabhängige Änderungen der Enzymaktivitäten nicht nachzuweisen, wobei jedoch starke individuelle Schwankungen auftreten (Abbildung 9).
- LDH:** Für die LDH-Aktivität kann eine ansteigende Tendenz proportional zur Konzentrationserhöhung beobachtet werden. Es treten jedoch starke individuelle Schwankungen, besonders beim 0,04 ppm-Prüfansatz auf (Abbildung 9).
- CK:** Die Plasmaaktivitäten der CK zeigen eine extreme Streuung vor allem für die beiden oberen Testkonzentrationen; konzentrationsabhängige Tendenzen zu Aktivitätsänderungen sind nicht belegbar.
- HBDH:** Für die HBDH-Aktivität treten keine deutlichen Veränderungen bei den Tieren der Testkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Abbildung 9: Plasmaaktivitäten verschiedener Enzyme nach
14tägiger Atrazinexposition



○ = statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe

3.4 Pathologisch-anatomische Befunde

Bei der Sektion konnte eine mittelgradig ausgeprägte Anämie von Kiemen, Herz, Leber und Muskulatur der Forellen für die Prüfkonzentrationen 0,02 und 0,04 ppm festgestellt werden. Bei der 0,01 ppm-Prüfkonzentration konnte nur eine geringgradig ausgeprägte Anämie der Kiemen beobachtet werden. Bei 3 Tieren des 0,04 ppm-Testansatzes wurde eine deutliche Milzvergrößerung diagnostiziert, wobei die Organränder deutlich abgestumpft waren.

V. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In einem Kurzzeittest (48/96 h) und zwei Langzeittests (14 und 28 Tage) wurde versucht, die Toxizität von Atrazin für Regenbogenforellen für unterschiedliche Testkonzentrationen zu ermitteln. Im Folgenden sollen die Versuchsergebnisse zusammengefaßt und unter Berücksichtigung folgender Fragen diskutiert werden:

- Sind die dargestellten Veränderungen ausschließlich auf eine Atrazinwirkung zurückzuführen?
- Können klinisch nicht diagnostizierbare, subakute Schädigungen atrazinexponierter Regenbogenforellen mit den Methoden der Enzymdiagnostik erfaßt werden?
- Ab welcher Atrazinkonzentration (Schwellenkonzentration) kann mit Hilfe der dargestellten Methoden eine Giftwirkung nachgewiesen werden?
- Sind die Ergebnisse des Kurzzeittests mit denen der Langzeittests vergleichbar?

1. Hämatologische Parameter beeinflussende Faktoren

Es ist bekannt, daß die hämatologischen Charakteristika des Fisches von zahlreichen Faktoren abhängig sind. So konnte der Einfluß von Ernährungszustand (SAUER und HAIDER, 1979) und Alter der Tiere (McCARTHY et al., 1973) gezeigt werden. Untersuchungen, die den Einfluß von Tageszeit (KÜNNEMANN et al., 1970), Wassertemperatur (SAUER und HAIDER, 1977), Fangmethode (BOUCK and BALL, 1966), Streß (SOIVIO and OIKARI, 1976) sowie Betäubungs- und Blutentnahmemethoden (HOFFMANN et al., 1982) dokumentieren, liegen ebenfalls vor.

Für die dargestellten Versuche standen Regenbogenforellen zur Verfügung, die hinsichtlich Alter, Größe, Gewicht und Gesundheitszustand eine weitgehende Homogenität aufwiesen.

Außerdem wurde versucht, Hälterungsbedingungen, Fütterung, Betäubungs- und Blutentnahmemethoden zu standardisieren. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß der Einfluß dieser Faktoren vernachlässigt werden kann und die beschriebenen Veränderungen allein auf eine Atrazinwirkung zurückzuführen sind.

2. Klinische Befunde

Ein von GUNKEL und KAUSCH (1976) bei Sandfelchen beobachtetes Fluchtverhalten nach Atrazinexposition (akuter Test) konnte in den eigenen Versuchen nicht beobachtet werden. Ein solches Fluchtverhalten wird von den Autoren als erstes Stadium einer Atrazinvergiftung beschrieben. Dieser Widerspruch ist durch die unterschiedlichen Testkonzentrationen der beiden Untersuchungen zu erklären. Während GUNKEL und KAUSCH (1976), bei denen unter anderem der Tod der Versuchstiere als Kriterium der toxischen Wirkung diente, in einem Konzentrationsbereich von 3 - 45 ppm untersuchten, lagen die Maximalkonzentrationen im vorliegenden Fall bei 1,4 und 2,8 ppm. Letale Atrazinkonzentrationen wurden, bedingt durch die andere Zielsetzung und aus Tierschutzgründen, bewußt vermieden. Die Vergiftungssymptomatik des weiteren Versuchsverlaufes zeigt dagegen gute Übereinstimmung. So konnte in beiden Untersuchungen eine sich mit zunehmender Versuchsdauer verstärkende Apathie der Tiere beobachtet werden. Einer Kompensation von Vergiftungssymptomen bei einem Teil der Tiere, wie sie von den o.a. Autoren beschrieben wird, entspricht die im vorliegenden Versuch nachgewiesene wieder abnehmende Tendenz der Atemfrequenzen nach 24stündiger Versuchsdauer. Eine diffuse Dunkelfärbung der Haut, wie sie bei den Regenbogenforellen im Kurzzeittest und für den 0,08 ppm-Prüfansatz auftrat, konnte auch von MACEK (1976) bei Atrazin-exponierten Fischen beobachtet werden. Diese vermehrte Dunkelpigmentierung wurde bereits von WALSH (1975) beobachtet und als Ausdruck eines verminderten Sehvermögens, bedingt durch einen erhöhten Intraorbitaldruck, interpretiert. Auch für die vorliegende Untersuchung könnte diese Erklärung zutreffen,

da bei einem Teil der Tiere ein ausgeprägter Exophthalmus festgestellt wurde. Bezüglich des Raumverhaltens Atrazin-exponierter Tiere können deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen anderer Untersuchungen festgestellt werden. Während WALSH (1975) einen bevorzugten Aufenthalt der Fische direkt unter der Wasseroberfläche beschreibt, hielten sich die Tiere im vorliegenden Versuch u.a. in Bodennähe und in den Ecken der Prüfgefäße auf. Allgemein können solche Veränderungen, ebenso wie die bei zwei Tieren aus dem 2,8 ppm-Prüfansatz aufgetretenen Gleichgewichtsstörungen, durch eine Schädigung der Schwimmblase verursacht werden. Da für beide Testkonzentrationen des Kurzzeittests Blutungen der Schwimmblasenwand festgestellt wurden, sind Störungen der Gassekretion bzw. -resorption des Organs wahrscheinlich. Dies hat zur Folge, daß die Fische die Fähigkeit verlieren, ihre Position im Wasser aufrechtzuerhalten (ROBERTS und SCHLOTFELDT, 1985). Die Abkuglung einzelner Epithelzellen der Darmmucosa und deren Ablösung ins Darmlumen kann nach ROBERTS und SCHLOTFELD (1985) als Reaktion auf eine toxische Schädigung gewertet werden. "Transsudatansammlungen" im Magen-Darm-Trakt von Regenbogenforellen werden von KOPRIVA (1981) als charakteristisches Symptom einer Atrazinvergiftung beschrieben; eine histologische Untersuchung des Transsudates erfolgte jedoch nicht. Daß ähnliche Symptome nicht auch für die wesentlich höheren Atrazinkonzentrationen ausgesetzten Sandfelchen in den Versuchen von GUNKEL und KAUSCH (1976) auftraten, könnte durch eine höhere Empfindlichkeit der Regenbogenforelle gegenüber Atrazin bedingt sein.

3. Hämatologische Veränderungen

Intoxikationen führen bei Knochenfischen zu charakteristischen hämatologischen Veränderungen (LEHMANN und STÜRENBERG, 1981). Auch in vorliegender Untersuchung konnten solche Veränderungen sowohl für den Kurzzeittest als auch für die beiden Langzeit-

tests nachvollzogen werden. Die teilweise bereits bei der Sektion diagnostizierte Anämie verschiedener Organe wurde durch die Blutuntersuchung bestätigt. Es zeigte sich hierbei eine deutlich konzentrationsabhängige Erniedrigung der Hämatokritwerte. Auch HORN und HANKE (1980) konnten bei Karpfen, die einer Atrazinkonzentration von 0,01 ppm ausgesetzt waren, eine deutliche Anämie feststellen.

Da im Kurzzeittest Blutungen der Schwimmblasenwand in unterschiedlichem Ausmaß diagnostiziert wurden, kann für diesen Versuch davon ausgegangen werden, daß die Anämie zumindest z.T. durch diese Blutverluste bedingt ist, wenn auch das Beteiligtsein anderer Faktoren nicht ausgeschlossen werden kann.

Zwar konnte histologisch kein vermehrter Hämosideringehalt in der Milz anämischer Tiere nachgewiesen werden, ein vermehrter Erythrozytenabbau ist deshalb jedoch nicht auszuschließen. Auch im Blutaussstrich ist eine Erythrozytenzerstörung nur schwer nachzuweisen, da defekte Erythrozyten schnell aus der Blutbahn entfernt werden (HOFFMANN, 1980). Eine hämolytische Anämie kann auch durch Instabilität der Erythrozyten-Zellmembran, wie sie durch eine Verminderung des Plasmacholesterolspiegels hervorgerufen werden kann, entstehen. Eine durch Atrazin bedingte Cholesterolspiegel-Senkung beim Karpfen wird von HORN und HANKE (1980) beschrieben.

Da sowohl im Kurzzeittest als auch im Langzeittest I eine proportional zur Konzentrationserhöhung steigende Tendenz zu Leberzellnekrosen auftritt und außerdem für die sogenannten "Leberenzyme" eine Aktivitätserhöhung im Plasma nachzuweisen ist, erscheint eine verminderte Cholesterols-Produktion der Leber möglich.

Für die Langzeittests kann auch - zumindest partiell - eine verminderte Erythrozyten-Produktionsrate im Haupt-Blutbildungsorgan Niere zur Erklärung der bestehenden Anämie herangezogen werden. Unterstützung findet diese These durch den deutlichen Plasma-Aktivitätsanstieg des Enzyms Alkalische Phosphatase

(AP), dessen höchste Aktivität nach Untersuchungen von SCHEINERT und HOFFMANN (1987) in der Niere gemessen werden kann. Eine Nierenschädigung ist deshalb als Ursache der Anämie in Betracht zu ziehen. Da einerseits die Lebensdauer von Fischerythrozyten mehrere Monate bis über ein Jahr betragen kann, andererseits die Erniedrigung des Hämatokritwertes sehr deutlich ausgeprägt ist, kann das Vorliegen einer aplastischen Anämie für den nur 48 bis 96 Stunden dauernden Kurzzeittest ausgeschlossen werden.

Trotz deutlicher Verringerung von Hämatokritwert und Erythrozytenzahl bei den Atrazin-exponierten Fischen bleibt der Hämoglobingehalt des Blutes weitgehend unbeeinflusst. Auch LARSSON (1975) konnte bei Fischtoxizitätstests mit Cadmium einen nur geringgradig erniedrigten Hämoglobingehalt bei gleichzeitig stark erniedrigtem Hämatokritwert beobachten und erklärte dieses Phänomen durch eine Volumenabnahme der Erythrozyten. Im vorliegenden Fall ist dieser Erklärungsversuch alleine jedoch nicht ausreichend. Zwar konnte für den Langzeittest eine Verringerung der Erythrozytenfläche nachgewiesen werden, da jedoch auch eine Abnahme der Erythrozytenzahl festgestellt wurde, muß ein Anstieg des Hämoglobingehaltes des Einzelerythrozyten gefolgert werden. Zur Unterstützung dieser Annahmen können die MCH (mean corpuscular hemoglobin)- bzw. MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration)-Werte herangezogen werden. Sowohl die Volumenverringerung der Erythrozyten als auch die erhöhten Hämoglobingehalte der Einzelerythrozyten drücken sich in erhöhten MCH- und MCHC-Werten aus.

Die durch Flächenmessung ermittelte Erythrozytenverkleinerung konnte durch die MCV (mean corpuscular volume)-Werte nicht bestätigt werden. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß sowohl MCV als auch MCH nur mit Zurückhaltung interpretiert werden sollten, da ihre Genauigkeit von der Erythrozytenzählung abhängig ist, bei der Fehler bis zu 15 % auftreten können.

Da Fischerythrozyten noch während ihrer Zirkulation im Blutkreislauf zur Hämoglobinsynthese befähigt sind (LANE, 1979), ist eine kompensatorische Hämoglobinproduktion bei Anämien denkbar. In diesem Sinne kann auch die Zunahme der Kernflächen im Langzeitversuch I als "funktionelle Kernschwellung" (LEONHARDT, 1980) und Ausdruck einer erhöhten Zellaktivität interpretiert werden.

Die Messungen an den Erythrozyten zeigen für den Kurzzeittest im Vergleich zum Langzeittest völlig konträre Ergebnisse. Neben einer deutlichen Zunahme der Erythrozyten-Querdurchmesser ist bei den Zellkernen eine Reduzierung der Flächen zu beobachten. Diese Befunde verdeutlichen, daß für Kurzzeittest und Langzeittest verschiedene toxische Wirkungsmechanismen vorliegen können. Störungen bei der Regulierung der Blutosmolalität könnten z.B. zu einer relativen Erhöhung der Elektrolytkonzentration in den Erythrozyten und damit zu ihrem Anschwellen führen.

4. Enzymdiagnostik in der Fischtoxikologie

Obwohl die Enzymdiagnostik in der Human- und Tiermedizin bereits seit langem erfolgreich eingesetzt wird, ist ihre Anwendung in der Fischtoxikologie noch relativ jung. Grundlegende Untersuchungen zum Enzymmuster verschiedener Organe der Regenbogenforelle (GAUDET, et al., 1975; SCHEINERT und HOFFMANN, 1987) sowie Normalwerte für die Plasmaaktivitäten dieser Enzyme (GAUDET et al., 1975; SAUER und HAIDER, 1979) liegen vor.

Änderungen verschiedener Plasmaenzymaktivitäten durch chemische Gifte konnten bereits für Tetrachlorkohlenstoff und das Pestizid Dieldrin, außerdem für verschmutztes Hafenwasser und Blei nachgewiesen werden (RACICOT et al., 1975; LANE and SCURA, 1970; MORGAN et al., 1973; SAUER, 1981).

Zwar können auch zahlreiche andere Faktoren die Enzymaktivitäten im Plasma gesunder Tiere beeinflussen (vgl. V. 1.), diese Einflußgrößen sind jedoch detailliert beschrieben und können daher weitgehend standardisiert werden. Dennoch darf nicht erwartet werden, daß ein einziges Enzym zur Diagnose spezieller Organschäden verwendet werden kann. Die Untersuchung mehrerer Enzyme stellt jedoch eine Ergänzung der klassischen Untersuchungsmethoden wie Pathologie und Pathohistologie dar (RACICOT et al., 1975). Gerade dem Histologen kann die Enzymdiagnostik Hinweise auf evtl. bestehende Organschäden geben und somit eine gezielte Diagnose erleichtern. Da auch bei subakuten und chronischen Intoxikationen Änderungen der Enzymaktivitäten auftreten können, ist deren Messung gerade auch zur Festlegung von "no-effect-levels" eine sehr brauchbare Methode.

Einschränkend muß erwähnt werden, daß bei der Auswahl der Serumenzyme auf die in der Human- und Tiermedizin diagnostisch wichtigen Enzyme zurückgegriffen wird und die Meßtemperatur bei den Aktivitätsbestimmungen immer 25°C beträgt. Es ist wahrscheinlich, daß Fischenzyme andere Temperaturoptima besitzen bzw. andere Enzyme besser zur Diagnose geeignet sind. Im Sinne eines schnell durchführbaren, erprobten und standardisierten Verfahrens mit guter Vergleichbarkeit sind diese Nachteile jedoch zu vertreten.

5. Enzymaktivitätsänderungen im Langzeitversuch

Bei einem Vergleich der für die Kontrollgruppe gemessenen Enzymaktivitäten mit den von SAUER und HAIDER (1976) angegebenen Normalwerten für die Regenbogenforelle fällt eine weitgehende Übereinstimmung der Werte auf. Dies verdeutlicht, wie bereits oben erwähnt, daß eine Standardisierung der Versuchsbedingungen zu vergleichbaren Ergebnissen führt.

Da die Enzymmuster für verschiedene Organe der Regenbogenforelle bekannt sind (SCHEINERT und HOFFMANN, 1987), ist es möglich, die beschriebenen Enzymaktivitätsänderungen mit einer

Schädigung bestimmter Organe in Verbindung zu bringen. So konnte gezeigt werden, daß die Enzyme GOT, GPT und GLDH zur Diagnose toxisch bedingter Lebererkrankungen geeignet sind. Die Plasmaaktivitätserhöhungen der Enzyme GOT und GPT im vorliegenden Fall können deshalb als Ausdruck einer Atrazin-bedingten Leberschädigung gewertet werden. Auch der konzentrationsabhängige Anstieg des LDH-Plasmaspiegels ist durch eine Leberschädigung erklärbar, da hohe Aktivitäten in diesem Organ nachzuweisen sind. Die LDH ist jedoch weniger leberspezifisch, da ihre höchsten Konzentrationen im Herz und in der Muskulatur gemessen werden. GAUDET et al. (1975) konnten auch in Erythrozyten relativ hohe LDH-Spiegel feststellen (6 IU/l), so daß für den LDH-Anstieg im Versuch auch ein Zusammenhang mit einem vermehrten Erythrozytenabbau diskutiert werden muß. In anaerober Stoffwechsellaage katalysiert LDH die Reaktion Pyruvat $\longleftrightarrow$ Laktat (BUDDECKE, 1980). Da bei anämischen Tieren auch eine Hypoxie und damit eine vermehrte Milchsäureproduktion in den Geweben erwartet werden kann, ist auch eine reaktiv erhöhte LDH-Synthese vorstellbar. Für den ursächlichen Zusammenhang des LDH-Anstiegs mit einer Leberschädigung spricht die proportional zur Konzentrationserhöhung steigende Tendenz zu Leberzellnekrosen, wie sie für den Langzeittest I festgestellt wurde (EWRINGMANN, in Bearb.).

Die höchsten GLDH-Aktivitäten sind bei der Regenbogenforelle in Niere und Leber zu messen. Unter der Annahme einer bestehenden Leberschädigung ist die statistisch hochsignifikante Abnahme der GLDH-Aktivität schwer zu interpretieren. Auch wenn die GLDH der Regenbogenforelle wie beim Säuger in den Mitochondrien lokalisiert ist, wäre zwar ein geringerer Aktivitätsanstieg im Vergleich zu den im Zytoplasma vorliegenden Enzymen GOT und GPT verständlich; eine Aktivitätsminderung wird hierdurch jedoch nicht erklärt. Als mögliche Ursachen einer verminderten Plasmaaktivität sind eine verminderte Syntheserate, eine direkte Enzymhemmung durch Atrazin sowie eine erhöhte Ausscheidungsrate des Enzyms zu nennen.

Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP), dem eine wichtige Funktion beim Stofftransport durch Zellmembranen zukommt, weist hohe Aktivitäten in den Organen Niere und Darm auf (SAUER und HAIDER, 1979). Die Eignung des Enzyms zur Nierendiagnostik wurde von SCHEINERT und HOFFMANN (1987) festgestellt. Im vorliegenden Versuch zeigt sich für den 0,04 ppm-Prüfansatz ein um etwa 50 % erhöhter Plasmaspiegel des Enzyms im Vergleich zu Kontrolltieren. Dieser Hinweis auf eine Schädigung von Darm und/oder Niere der Tiere sollte durch eine histologische Untersuchung überprüft werden.

6. Schwellenkonzentrationen der Atrazinwirkung für verschiedene Prüfparameter

Bei einem Vergleich der jeweils niedrigsten Konzentration mit noch feststellbarer Schadstoffwirkung fallen deutliche Unterschiede bei den verschiedenen Prüfparametern auf. So ist für klinische Veränderungen eine Schwellenkonzentration (S_c) von 0,08 ppm festzustellen, während Änderungen der Enzymaktivitäten noch bei einer Atrazinkonzentration von 0,02 ppm nachzuweisen sind. Die Schwellenkonzentrationen wichtiger Prüfparameter sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Schwellenkonzentrationen (S_c , in ppm) einer feststellbaren Atrazinwirkung für verschiedene Prüfparameter

Prüfparameter	Versuchsdauer	S_c
klinische Veränderungen	28 d	0,08
Hämatokritwert	14 d	0,04
	28 d	0,02
Erythrozyten-Querdurchmesser	28 d	0,01
Plasmaenzymaktivität	14 d	0,02

7. Vergleich der Methoden und Ergebnisse von Kurzzeittest und Langzeittest

Neben seiner relativ schnellen Durchführbarkeit ist der Kurzzeittest v.a. durch einen wesentlich geringeren Material- und Kostenaufwand im Vergleich zum Langzeittest charakterisiert. So kann z.B. auf aufwendige Dosiereinrichtungen verzichtet werden. Die methodische Einfachheit bedingt eine leichte Standardisierbarkeit des "Akuten Tests", wie es besonders im Hinblick auf vergleichbare Untersuchungsergebnisse wünschenswert ist. Die Eignung, relativ rasch eine grobe Orientierung über die relative Toxizität einer Prüfsubstanz zu vermitteln, läßt den Kurzzeittest eine zentrale Position in der Fischtoxikologie einnehmen (HOFER, 1988). So basiert z.B. auch die ökotoxikologische Einstufung eines Stoffes nach dem Chemikaliengesetz (Grundstufe) auf den Ergebnissen solcher Kurzzeittests.

Die oft recht drastischen Ergebnisse aus akuten Tests sind jedoch nicht geeignet, Voraussagen über die langfristige Toxizität der betreffenden Substanz zu treffen (SCHULZ, 1981; RUDOLPH, 1986), da z.B. mit Verzögerung eintretende Schädigungen nicht erfaßt werden können. Es ist bekannt, daß kleinere Giftmengen, über einen längeren Zeitraum verabreicht, einen grundsätzlich anderen Effekt haben können als die einmalige Aufnahme einer größeren Giftmenge (STÜNZI und WEISS, 1982). Deshalb ist das Verfahren, aus den Ergebnissen akuter Tests mit Hilfe von "Sicherheitsfaktoren" eine unbedenkliche Schadstoffkonzentration für natürliche Verhältnisse zu ermitteln, wissenschaftlich unzulässig (RUDOLPH, 1986).

Natürlich können auch in standardisierten 14 - 28tägigen Tests "natürliche" Verhältnisse nicht nachvollzogen werden. So bleiben z.B. Wechselwirkungen mit anderen Schadstoffen oder Anreicherung der toxischen Substanz in der Nahrungskette unberücksichtigt. Ein möglicher Einfluß der Prüfsubstanz auf physiologische Parameter wie Wachstum und Fortpflanzung findet ebenfalls keine Berücksichtigung. Vor allem durch die Anwen-

dung geeigneter Untersuchungsmethoden, wie Hämatologie, Histologie und Enzymdiagnostik ist es jedoch möglich, dezente, äußerlich nicht sichtbare Veränderungen nachzuweisen, die erst nach längerer Expositionszeit manifest werden. Da die getesteten Konzentrationsbereiche in Langzeittests wesentlich niedriger liegen als bei den akuten Tests - im vorliegenden Fall etwa um den Faktor 100 - und damit den "natürlich" vorhandenen Gewässerbelastungen wesentlich näher liegen, sind Rückschlüsse auf das tatsächliche Gefährdungspotential eines Stoffes eher möglich. In Langzeittests ermittelte Schwellenkonzentrationen, wie z.B. LOEC (lowest observed effect concentration)-Werte, sind deshalb aus ökotoxikologischer Sicht wesentlich aussagekräftiger. Auch in vorliegender Untersuchung können bei einem Vergleich von Kurzzeittest und Langzeittest nicht nur graduelle Unterschiede hinsichtlich der toxischen Wirkung von Atrazin festgestellt werden, sondern es treten auch grundsätzlich verschiedene Schadwirkungen auf. An den Ergebnissen der Erythrozyten-Messungen soll dies verdeutlicht werden: Während für den Kurzzeittest eine Flächenzunahme der Erythrozyten und eine Flächenabnahme der Erythrozytenkerne festgestellt wurde, ist im Langzeittest eine Abnahme der Erythrozytenflächen und eine Zunahme der Kernflächen zu beobachten.

Aus den dargestellten Ergebnissen wird deutlich, daß hämatologische Untersuchungen in Verbindung mit Enzymdiagnostik geeignet sind, subakute Schadwirkungen des Herbizids Atrazin in Konzentrationsbereichen weit unterhalb akuter Schadwirkungen nachzuweisen. Da die in natürlichen Gewässern gemessenen Atrazinkonzentrationen (z.B. Isar: 1,1 - 1,5 µg/l) die ermittelten Toxizitätsschwellenwerte nur um einen Faktor von etwa 20 - 80 unterschreiten, sind besonders unter Berücksichtigung der kurzen Versuchsdauer chronische Schadwirkungen an in solchen Gewässern lebenden Fischen nicht auszuschließen. Vergleichende Untersuchungen von Fischen aus Atrazin-kontaminierten Gewässern mit solchen aus unbelasteten Gewässern mit den dargestellten Methoden könnten über eine chronische Belastungssituation Aufschluß geben.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Bestimmung der Toxizität von Atrazin für Regenbogenforellen wurden drei Versuche durchgeführt:
 - a. Kurzzeittest (48 und 96 h; Atrazinkonzentration: 1,4 und 2,8 ppm)
 - b. Langzeittest (28 d; Atrazinkonzentration: 0,01; 0,02; 0,04 und 0,08 ppm)
 - c. Langzeittest (14 d; Atrazinkonzentration: 0,01; 0,02; 0,04 ppm).
2. Folgende Untersuchungsmethoden wurden angewendet:
 - a. Klinische Beobachtung
 - b. hämatologische Untersuchungen
 - c. Bestimmung von Plasmaenzymaktivitäten.
3. Im 48- und 96-Stunden-Test konnten Motilitätseinschränkungen, Atemfrequenzerhöhungen sowie eine deutliche Dunkelfärbung der Tiere festgestellt werden. Außerdem wurde bei einem Teil der Tiere ein Exophthalmus sowie eine Änderung des Raumverhaltens beobachtet.
4. Bei allen Tests konnte eine konzentrationsabhängige Erniedrigung des Hämatokritwertes, im 14-Tage-Versuch zusätzlich eine Verminderung der Erythrozytenzahl gemessen werden.
5. Die Messungen an den Erythrozyten ergaben deutliche Veränderungen, wobei sich die Ergebnisse von Kurzzeit- und Langzeittest deutlich unterscheiden:
 - a. Kurzzeittest: Zunahme der Erythrozyten-Querdurchmesser
Abnahme der Erythrozytenkern-Flächen
 - b. Langzeittest: Abnahme der Erythrozyten-Querdurchmesser
Zunahme der Erythrozytenkern-Flächen

6. Die Plasmaaktivitäten der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Alkalischen Phosphatase (AP) sind im 14-Tage-Versuch bei einer Atrazin-konzentration von 0,04 ppm statistisch signifikant erhöht. Proportional zur Konzentrationserhöhung ansteigende Plasma-aktivitäten konnten für die Lactat-Dehydrogenase (LDH) nachgewiesen werden. Eine hochsignifikante Verminderung der Plasmaaktivität konnte für die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) festgestellt werden.

SUMMARY

Clinical and haematological examinations of subacute toxicity of Atrazine on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)

1. To determine the toxicity of Atrazine on rainbow trout, 3 tests were performed:
 - a. short-term-test (48 and 96 h; Atrazine-concentration: 1.4 and 2.8 ppm)
 - b. long-term-test (28 d; Atrazine-concentration: 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 ppm)
 - c. long-term-test (14 d; Atrazine-concentration: 0.01; 0.02, 0.04 ppm)
2. Following examinations were performed:
 - a. clinical observation
 - b. haematological studies
 - c. determination of plasmatic enzyme activities
3. For the 48- and 96-hours-test a decreased motility, an increased respiratory-frequency and a marked darkening of fishes was seen. Furthermore some of the fishes showed exophthalmus and alteration of space adaption.
4. In relation to the concentration of Atrazine, packed cell volume (hematocrit) decreased in all tests; the 14-days-test proved a reduction of red cell counts.
5. Measures of erythrocytes showed clear changes, whereby results of short-term-test and long-term-test were different:
 - a. short-term-test: increased cross-diameter of erythrocytes
decreased area of erythrocyte-nuclei
 - b. long-term-test: decreased cross-diameter of erythrocytes
increased area of erythrocyte-nuclei

6. The 14-days-test proved a significant increase of plasmat-
tic activities of Glutamic-Oxalacetic-Transaminase (GOT),
Glutamic-Pyruvic-Transaminase (GPT) and Alkaline Phos-
phatase (AP) for the 0.04 ppm-testconcentration. The acti-
vity of Lactate Dehydrogenase (LDH) showed a dosedependent
increase. A significant decrease of plasmatic level was
seen for Glutamate-Dehydrogenase (GLDH).

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- ANONYM (1983): Verwendung von Pflanzenschutzmitteln in Wasserschutzgebieten (Positivkatalog) - Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Baden-Württemberg
- BARDACH, J.E. and LIFE, J.S. (1976): Pollution effects on fish - aus: Pfäfflin/Ziegler: Encyclopedia of Environmental Science and Engineering, Vol. Two, 688-694. Gordon and Breach Science Publishers; New York
- BATHE, R. und ULLMANN, L. (1972): Toxizitätsbestimmung von Pflanzenschutzmitteln an Fischen - Schriftenreihe Verein Wasser-, Boden-, Lufthygiene, 37, Berlin-Dahlem
- BIAGIANTI, S. (1986): Cytopathological effects of a herbicide (a s-triazine: Atrazine) on the liver of grey mullet juveniles - Pathology in marine aquaculture, Special publication No. 9. Bredene, Belgium.
- BITTNER, A., MÜLLER, R., KEPPLER, R., KHAN, K. und HANKE, W. (1980): Veränderungen des Elektrolytgehaltes im Blut von Karpfen unter dem Einfluß von Umweltgiften - aus: Hanke, W.: Untersuchungen über den Einfluß von Schadstoffen auf Fische - Forschungsbericht der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie am Zoologischen Institut der Universität Karlsruhe
- BOUCK, G. R. and BALL, R.C. (1966): Influence of capture method on blood characteristic and mortality in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) - Trans. Am. Fish. Soc. 95, 170-176
- BRAUN, F., SCHÜSSLER, W. und WEHRLE, R. (1987): Organische Schadstoffe. Polychlorbiphenyle (PCB) und Pestizide im Kreislauf des Wassers: Bilanzierung und Bewertung - Bericht der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung, München
- BUDDECKE, E. (1980): Grundriß der Biochemie - de Gruyter, Berlin, New York
- Bundesamt für Ernährung und Forstwirtschaft (1983): Wirkungen ausgewählter Herbizidwirkstoffe auf Ökosystemkomponenten - Arbeitsmaterialien des BEF, Frankfurt
- Deutscher Verband für Wasserwirtschaft und Kulturbau e.V. (1985): Datensammlung zur Abschätzung des Gefährdungspotentials von Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen für Gewässer, 74, Paul Parey Verlag, Hamburg und Berlin

- FUNDERBURK, H.H. and DAVIS, D.E. (1963): The metabolism of C¹⁴ chain - and ring - labeled simazine by corn and the effect of atrazine on plant respiratory system - Weeds 11, 101-104
- GAUDET, M., RACICOT, J.-G. and LERAY, C. (1975): Enzyme Activities of plasma and selected tissues in rainbow trout (salmo gairdneri Richardson) - J. Fish Biol. 7, 505-512
- GISSL, H. und HURLE, K. (1984): Pflanzenschutzmittel und Grundwasser - Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- GLUTH, G. and HANKE, W. (1985): A comparison of Physiological Changes in Carp, Cyprinus carpio, Induced by Several Pollutants at Sublethal Concentrations - Ecotoxicology and Environmental Safety 9, 179-188
- GODE, P. (1980): Methoden zur Prüfung der subakuten Toxizität - aus: DFG-Forschungsbericht: Methoden der Toxizitätsprüfung an Fischen; Situation und Beurteilung - H. Boldt Verlag, Boppard, 83-87
- GUNKEL, G. (1981): Bioaccumulation of a herbicide (Atrazine, s-Triazine) in the whitefish (Coregonus fera J.): Uptake and distribution of the residue in fish - Arch. Hydrobiol., Suppl. 59, 2/3 252-287
- GUNKEL, G. (1983): Untersuchungen zur ökotoxikologischen Wirkung eines Herbizides in einem aquatischen Modellökosystem. 1. Subletale und letale Effekte - Arch. Hydrobiol., Suppl. 65, 2/3, 253-267
- GUNKEL, G. (1984): Untersuchungen zur ökotoxikologischen Wirkung eines Herbizides in einem aquatischen Modellökosystem. 2. Nahrungskettenprobleme und Schadstoffbilanzierung - Arch. Hydrobiol., Suppl. 69, 1, 130-168
- GUNKEL, G. (1987): Mechanismen der Aufnahme und Verteilung von organischen Schadstoffen in aquatischen Organismen. aus: Bioakkumulation in Nahrungsketten - DFG-Forschungsbericht, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- GUNKEL, G. und KAUSCH, H. (1976): Die akute Toxizität von Atrazin (s-Triazin) auf Sandfelchen (Coregonus fera Jurine) im Hunger - Arch. Hydrobiol., Suppl 48, 2, 207-234
- GUNKEL, G. and STREIT, B. (1980): Mechanisms of bioaccumulation of a herbicide (Atrazine, s-Triazine) in a freshwater mollusk (Ancylus fluviatilis MÜLL.) and a fish (Coregonus fera JURINE) - Water Res. 14, 1573-1584

- HABERER, K. und NORMANN, S. (1988): Pflanzenschutzmittel aus der Sicht der öffentlichen Wasserversorgung, Teil I und II. - Wasser und Boden 4, 177-183 und 5, 258-264
- HABERER, K., KARRENBROCK, F. und OEHMISCHEN, U. (1985): Auftreten von Stickstoffherbiziden in Oberflächengewässern - gwf-wasser/abwasser 126, 482
- HALL, J.K. (1974): Erosional losses of s-triazine herbicides - J. Env. Qual., 3, 174
- HALL, J.K., PAWLUS, M. and HIGGINS, E.R. (1972): Losses of atrazine in runoff water and soil sediments - J. Env. Qual., 1, 172-176
- HERBST, J. (1985): Die Bedeutung biologischer Tests zur Wasserqualitäts- und Abwasserkontrolle - Diplomarbeit aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik/ Abt. Aquakultur der Georg-August-Univ. Göttingen
- HOFER, R. (1988): LC-50-Versuche an Fischen - ein zeitgemäßer Toxizitätstest? - Österreichs Fischerei 41, 45-47
- HOFFMANN, R. (1980): Untersuchungen des roten Blutbildes bei Viraler Hämorrhagischer Septikämie (VHS) der Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) - Fisch und Umwelt 8, 37-48
- HOFFMANN, R., PFEIL-PUTZIEN, C. und VOGT, M. (1978): Zytochemische Untersuchungen an Blutzellen dreier Teleostier-spezies (Karpfen - *Cyprinus carpio* L., Regenbogenforelle - *Salmo gairdneri* Richardson und Hecht - *Esox lucius* L.) Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 345-350
- HOFFMANN, R., LOMMEL, R. and RIEDEL, M. (1982): Influence of different anaesthetics and bleeding methods on hematological values in fish - Arch. Fisch. Wiss. 33, 91-103
- HORN, G. und HANKE, W. (1980): Hämatologische Veränderungen bei Karpfen unter dem Einfluß von Atrazin - aus: Hanke, G.: Untersuchungen über den Einfluß von Schadstoffen auf Fische - Forschungsbericht der Arbeitsgruppe Ökotoxikologie am Zoologischen Institut der Universität Karlsruhe
- Industrieverband Pflanzenschutz e.V. (1982): Wirkstoffe in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Frankfurt
- IRMER, H. KÜHN, R., HANSEN, P.-D. und TRENEL, J. (1986): Zur Bewertung der "Umweltverträglichkeit gefährlicher Stoffe im aquatischen Bereich - Bundesgesundheitsblatt 29, 317-321
- KENAGA, E.E. (1982a): Review: The use of environmental toxicology and chemistry data in hazard assessment: progress, needs, challenges - Environmental toxicology and chemistry 1, 69-79

- KENAGA, E.E. (1982b): Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates - Environmental toxicology and chemistry 1, 347-358
- KETTLE, W.D., F.de NOYELLES, Jr., HEACOCK, B.D. and KADOUM, A.M. (1987): Diet and Reproductive Success of Bluegill Recovered from Experimental Ponds treated with Atrazine - Bull. Environ. Contam. Toxicol. 38, 47-52
- KOPRIVA, J. (1981): Toxicity of triazine and diazine based herbicides to fishes - Agrochemia Bratislava 21, 344-347
- KORTE, F., GREIM, H. et al. (1981): Überprüfung der Durchführbarkeit von Prüfungsvorschriften und der Aussagekraft der Grundprüfung des E. Chem. G. - Bericht der GSF München, Inst. f. Ökolog. Chemie und Inst. f. Biochem. u. Toxikol., an das Umweltbundesamt, Berlin. Forschungsbericht Nr. 107 04 006/1
- KOSINSKI, R.J. and MERKLE, M.G. (1984): The effects of 4 terrestrial herbicides on the Productivity of artificial stream algal-communities - J. Env. Qual. 13, 75-82
- KÜNNEMANN, H., LAUDIEN, H. und PRECHT, H. (1970): Der Einfluß von Temperaturänderungen auf Enzyme der Fischmuskulatur. Versuche mit Goldorfen (*Idus idus*) - Marine Biology 7, 71-81
- LANE, H.C. (1979): Some haematological responses of normal and splenectomized rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to a 12 % blood loss - J. Fish Biol. 14, 159-164
- LANE, CH.E. and SCURA, E.D. (1970): Effects of dieldrin on glutamatic oxalacetic transaminase in *Poecilia latipinna* - J. Fish. Res. Bd. Canad 27, 1869-1871
- LARRSON, A. (1975): Some biochemical effects of cadmium on fish - aus: Koeman, J.H. and Strik, J.J.T.W.A.: Sublethal effects of toxic chemicals on aquatic animals - Elsevier Scient. Publ. Comp., Amsterdam, Oxford, New York, 35-45
- LEDERER, R. (1983): Möglicher Einfluß von Atrazin auf die Teilungsaktivität und die Schwesterchromatidaustausch-Rate in Schweinelymphozytenkulturen - Diplomarbeit am Institut für Tierzüchtung der technischen Universität München/Weihenstephan

- LEHMANN, J. und STÜRENBERG, F.-J. (1981): Die Auswertbarkeit von Blutparametern und Methoden zu ihrer Bestimmung in der Fischtoxikologie - Fisch und Umwelt **9**, 25-39
- LEONHARDT, H. (1980): Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen - Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- MACEK, K.J., BUXTON, K.S., SAUTER, S., GNILKA, S. and DEAN, J.W. (1976): Chronic toxicity of atrazine to selected aquatic invertebrates and fishes - Ecological research series **600/ 3-76-047**, Washington D.C.
- MAIER-BODE, H. (1971): Herbizide und ihre Rückstände - Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- MCCARTHY, D.H., STEPHENSON, J.P. and ROBERTS, M.S. (1973): Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. The Kamloops variety - J. Fish Biol. **5**, 1-8
- MOHR, A. (1984): Gasübersättigung und Gasblasenkrankheit - Fischer und Teichwirt **35**, 37-40
- MORGAN, R.P., FLEMING, R.F., RASING, V.J. and HEINLE, D.R. (1973): Sublethal effects of Baltimore Harbour water on the white perch (*Morone americana*) and the hog-choker (*Trinectes maculatus*) - Chesapeake Science **14**, 17-27
- MOUNT, D.I. and STEPHAN, C.E. (1976): A Method for Establishing Acceptable Toxicant Limits for Fish - Malathion and the Butoxyethanol Ester of 2,4-D - Trans. Am. Fish. Soc. **96**, 185
- NATT, M.P. and HERRICK, C.A. (1952): A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken - Poultry science, **31**, 735-738
- PENSEL, TH. (1985): Auswirkungen der Anwendung atrazinhaltiger Herbizide im Maisanbau auf nahegelegene Fließgewässer - Diplomarbeit aus dem Institut für Biogeographie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
- PERKOW, W. (1985): Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel - Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- POTT, E. (1982): Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Herbiziden auf die Futterraufnahme von *Daphnia pulex* TORBES - Arch. Hydrobiol., Suppl. **59**, 330-358
- RACICOT, J.-G., GAUDET, M. and LERAY, C. (1975): Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) with emphasis on their diagnostic use: Study of CCl₄ toxicity and a case of *Aeromonas* infection. J. Fish Biol. **7**, 825-835

- RAND, G.M.(1980): Detection: Bioassay - aus: Guthry F.E. and Perry, J.J.: Introduction to Environmental Toxicology - Elsevier North Holland, Inc., New York, 390-403
- RIPPEN, G.(1987): Handbuch Umweltchemikalien: Stoffdaten, Prüf- und Nachweisverfahren, Vorschriften, Richtlinien - Landsberg/Lech: ecomed-Verlagsgesellschaft
- ROBERTS, R.J. und SCHLOTFELDT, H.-J. (1985): Grundlagen der Fischpathologie - Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- RUDOLPH, P. (1986): Ökotoxikologie: Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz - ecomed-Verlagsgesellschaft, Landsberg
- SAUER, D.(1981): Enzyme als Parameter der Intoxikation - DFG-Forschungsbericht: Methoden der Toxizitätsprüfung an Fischen - H. Boldt Verlag, Boppard, 117-119
- SAUER, D.M. and HAIDER, G. (1977): Enzyme activities in the serum of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of water temperature - J. Fish Biol. **11**, 605-612
- SAUER, D.M. and HAIDER, G. (1979): Enzyme activities in the plasma of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of nutritional status and salinity - J. Fish Biol. **14**, 407-412
- SCHEINERT, P. und HOFFMANN, R. (1987): Qualitative und quantitative Verteilung von sieben Enzymen in Organen der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* R.) und des Karpfens (*Cyprinus carpio*) - J. Vet. Med. A. **34**, 339-343
- SCHOBER, U. and LAMBERT, W. (1977): Effects of sublethal concentrations of the herbicide Atrazine on growth and reproduction of *Daphnia pulex* - Bull. Environ.Contam. Toxicol. **17**, 269-277
- SCHULZ, D. (1980): Prüfung der subakuten Toxizität mit besonderer Berücksichtigung der makroskopischen und mikroskopischen pathologischen Anatomie - aus: DFG-Forschungsbericht: Methoden der Toxizitätsprüfung an Fischen - H. Boldt Verlag, Boppard, 88-96
- SCHULZ, D. (1981): Herbizide im Fisch. Wirkungen und Rückstände - Fisch und Umwelt **10**, 1-17
- SOIVIO, A. and OIKARI, A. (1976): Haematological effect of stress on a teleost, *Esox lucius* L. - J. Fish Biol. **8**, 397-411

- STREIT, B. (1979): Uptake, accumulation and release of organic pesticides by benthic invertebrates. 3.: Distribution of ^{14}C -atrazine and ^{14}C -lindane in an experimental 3-steps food chain microcosm - Arch. Hydrobiol., Suppl. 55, 373-400
- STREIT, B. and PETER, H.-M. (1978): Long-term effects of Atrazine to selected freshwater invertebrates - Arch. Hydrobiol., Suppl. 55, 62-77
- STÜNZI, H. und WEISS, E. (1982): Allgemeine Pathologie - Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- TORRES, A.M.R. and O'FLATHERY, L.M. (1976): Influence of pesticides on chlorella, Chlorococcum, Stigeoclonium (Chlorophyceae) (Cyanophyceae) - Phycologia 15, 25-36
- WALSH, R. (1975): Pathology of Pesticide Poisoning - aus: Ribelin, W. and Migaki, G.: The pathology of fishes, University of Wisconsin Press

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine stete Hilfsbereitschaft und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. R.-D. Negele gilt mein besonderer Dank für seine ständige Anleitung und Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Untersuchungen.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. M. Bohl für die Möglichkeit, die Untersuchungen an der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung, Versuchsanlage Wielenbach, durchzuführen.

Herrn Dr. Th. Ewringmann danke ich für die kameradschaftliche Zusammenarbeit und seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Dr. Th. Fischer-Scherl und Herrn Dr. P. Scheinert danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und ihre zahlreichen Hinweise und Anregungen.

Gedankt sei auch Frau R. Leyrer, Frau A. Möschler und Frau F. Schloßbauer für ihre vielfältige Hilfe sowie Herrn H. Bormann für die Bereitstellung und Betreuung der Versuchstiere.

Lebenslauf

Heinz Ludwig Guthmann

Geboren:	21. September 1961 in Wassertrüdingen
Eltern:	Renate Guthmann, geb. Maueröder Egon Guthmann
Schulbildung:	1969 - 1973 Grundschule Gunzenhausen 1973 - 1981 Simon-Marius-Gymnasium, Gunzenhausen
Grundwehrdienst:	1981 - 1982 in Heidenheim
Studium:	1983 - 1987 Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München
Approbation:	22. Januar 1988
Dissertation:	seit November 1987

